

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 434**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)
B01D 15/26 (2006.01)
B01D 15/38 (2006.01)
B01J 20/282 (2006.01)
C07K 1/20 (2006.01)
B01J 20/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2009 PCT/US2009/062528**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2010 WO10051360**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2009 E 09748620 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2350130**

54 Título: **Purificación de proteínas ácidas utilizando cromatografía de hidroxapatita cerámica**

30 Prioridad:

31.10.2008 US 110468 P

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

11.02.2019

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
 235 East 42nd Street
 New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**SUN, SHUJUN;
 LUO, YIN y
 JENNINGS, PRISCILLA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 699 434 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Purificación de proteínas ácidas utilizando cromatografía de hidroxiapatita cerámica

5 **Campo de la invención**

La presente invención describe un procedimiento para eliminar especies derivadas de productos parcialmente activos y/o inactivos, agregados de alto peso molecular y otras impurezas de proteínas ácidas, por ejemplo, proteínas de fusión de Ig, usando cromatografía de hidroxiapatita cerámica. Bajo las condiciones de unión y elución operativas específicas proporcionadas en esta invención, el producto de proteína ácida, por ejemplo, el producto de proteína ácida de fusión de Ig, se puede separar de las impurezas derivadas del producto y del proceso con una alta capacidad de unión a la resina y un buen rendimiento del producto.

15 **Antecedentes de la invención**

Es deseable identificar procedimientos útiles para purificar proteínas que no destruyan, o reduzcan significativamente, la actividad biológica de la proteína. Los contaminantes deben eliminarse de las preparaciones de proteínas, tal como las preparaciones de proteínas ácidas (por ejemplo, las preparaciones de proteínas de fusión con inmunoglobulina (Ig)), antes de que puedan usarse en aplicaciones de diagnóstico, aplicaciones terapéuticas, biología celular aplicada y estudios funcionales. Por ejemplo, las preparaciones de proteínas, por ejemplo, las preparaciones de proteínas ácidas, a menudo contienen componentes no deseados (impurezas), tal como especies inactivas y/o parcialmente activas y agregados de alto peso molecular (HMWA). La presencia de especies inactivas y/o parcialmente activas no es deseable porque estas especies tienen una capacidad de unión al objetivo significativamente menor en comparación con la proteína activa; por lo tanto, la presencia de especies inactivas y/o parcialmente activas puede reducir la eficacia del producto. La formación de agregados, por ejemplo, HMWA, puede afectar negativamente a la seguridad del producto al causar la activación del complemento o anafilaxis tras la administración. Además, la formación de agregados puede obstaculizar los procesos de fabricación al reducir el rendimiento del producto, la ampliación del pico y la pérdida de actividad.

Los procedimientos de purificación de proteínas más comunes se basan en las diferencias en el tamaño, la carga y la solubilidad entre la proteína a purificar y los contaminantes. Los protocolos basados en estos parámetros incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de interacción hidrófoba. Sin embargo, estos procedimientos cromatográficos a veces presentan dificultades técnicas en la separación de especies agregadas o multiméricas de proteínas, por ejemplo, proteínas que contienen IgG. Técnicas tales como el intercambio iónico y la cromatografía de interacción hidrófoba, por ejemplo, pueden inducir la formación de agregados debido a un aumento de la concentración de proteína o los cambios requeridos en la concentración del regulador y/o el pH durante la elución. Además, en varios casos las proteínas muestran diferencias en los puntos isoeléctricos que son demasiado pequeños para permitir su separación mediante cromatografía de intercambio iónico. Tarditi, (1992) J. Immunol. Methods 599: 13-20. La cromatografía de exclusión por tamaño es engorrosa y da como resultado una dilución significativa del producto, lo que constituye un obstáculo en los procesos de fabricación a gran escala y basados en la eficiencia. También pueden producirse pérdidas de ligandos de las columnas de cromatografía de afinidad, lo que da como resultado una contaminación indeseable del producto eluido. Steindl (2000) J. Immunol. Methods 235: 61-69. De interés, los solicitantes no pudieron eliminar las especies inactivas o parcialmente activas mediante el intercambio iónico, por ejemplo, el intercambio aniónico o la cromatografía de interacción hidrófoba.

La cromatografía de hidroxiapatita es un procedimiento de purificación de proteínas que utiliza un fosfato de calcio hidroxilado insoluble $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, que forma la matriz y el ligando. Los grupos funcionales consisten en pares de iones de calcio cargados positivamente (sitios C) y agrupaciones de grupos fosfato cargados negativamente (sitios P). Las interacciones entre la hidroxiapatita y las proteínas son complejas y multimodales. En un procedimiento de interacción, los grupos amino cargados positivamente en las proteínas se asocian con los sitios P cargados negativamente, y los grupos carboxilo de la proteína interactúan mediante la complejación de coordinación con los sitios C. Shepard (2000) J. of Chromatography 891: 93-98. Por lo tanto, las proteínas ácidas y básicas generalmente interactúan con la resina de cHA a través de diferentes mecanismos: una proteína ácida generalmente se une a los sitios C mediante un enlace de coordinación con el grupo carboxilo, mientras que una proteína básica se une a los sitios P a través de la interacción de carga con el grupo amina.

La hidroxiapatita cristalina fue el primer tipo de hidroxiapatita usada en cromatografía, pero estuvo limitado por dificultades estructurales. La cromatografía de hidroxiapatita cerámica (cHA) se desarrolló para superar algunas de las dificultades asociadas con la hidroxiapatita cristalina, tales como las velocidades de flujo limitadas. La hidroxiapatita cerámica tiene una alta durabilidad, buena capacidad de unión a proteínas, y se puede usar a altas velocidades de flujo y presiones más altas que la hidroxiapatita cristalina. Vola et al. (1993) BioTechniques 14: 650-655. La separación cromatográfica mediante cHA se puede realizar en varios modos distintos, tal como el modo de enlace, el modo de flujo continuo o una combinación de modo de enlace / flujo continuo.

65

La cromatografía de hidroxapatita se ha utilizado en la separación cromatográfica de proteínas, ácidos nucleicos y anticuerpos. Sin embargo, en varios casos, los investigadores no han podido eluir selectivamente los anticuerpos de la hidroxapatita o encontraron que la cromatografía de hidroxapatita no dio como resultado un producto suficientemente puro. Junbauer, (1989) J. Chromatography 476: 257-268; Giovannini, (2000) Biotechnology and Bioengineering 73: 522-529. Una separación exitosa de anticuerpos y otras proteínas básicas de las impurezas, tales como HMWA, utilizando la cromatografía de cHA en el modo de unión, flujo continuo o combinación de modo de unión/ flujo continuo, se ha demostrado en la publicación de los Estados Unidos N° 2005-0107594. Se conocen varios procedimientos de purificación, que se basan en cromatografía de hidroxapatita, por ejemplo, a partir de los documentos WO2005/044856, US2005/107594 y Gorbunoff (1985) Methods in Enzymology vol. 182: 329-39. La presente invención proporciona un nuevo procedimiento para eliminar especies parcialmente activas y/o inactivas relacionadas con el producto, así como otras impurezas, tales como HMWA, de proteínas ácidas, por ejemplo, proteínas de fusión de Ig, que utilizan técnicas de cromatografía de cHA.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona procedimientos para eliminar impurezas, tales como agregados de alto peso molecular, especies inactivas y/o parcialmente activas, así como otras impurezas de preparaciones de proteínas ácidas utilizando cromatografía de hidroxapatita. Por lo tanto, en una realización de la invención, la invención proporciona un procedimiento para purificar al menos una proteína ácida de interés de una preparación de proteínas que contiene impurezas, en el que el procedimiento comprende aplicar un regulador de equilibrio que comprende un catión de metal divalente a resina de hidroxapatita, poniendo en contacto la resina de hidroxapatita con la preparación de proteína en un regulador de carga, lavando la resina de hidroxapatita con un regulador de lavado que comprende el catión de metal divalente y eluyendo al menos una proteína ácida de la resina de hidroxapatita con un regulador de elución que contiene fosfato.

En algunas realizaciones de la invención, las impurezas son especies inactivas y/o parcialmente activas de al menos una proteína ácida. Por lo tanto, otra realización de la invención proporciona un procedimiento para purificar al menos una proteína ácida de interés de una preparación de proteínas que contiene especies inactivas y/o parcialmente activas de al menos una proteína ácida, que comprende poner en contacto una resina de hidroxapatita con la preparación de proteínas; y eluir al menos una proteína ácida de interés por separado de las especies inactivas y/o parcialmente activas. Otra realización de la invención proporciona un procedimiento para purificar al menos una proteína ácida de interés de una preparación de proteínas que contiene especies inactivas y/o parcialmente activas de la proteína de interés, que comprende aplicar un regulador de equilibrio que comprende un catión de metal divalente a resina de hidroxapatita, poniendo en contacto la resina de hidroxapatita con una preparación de proteína en un regulador de carga que comprende el catión de metal divalente, lavando la resina de hidroxapatita con un regulador de lavado que comprende el catión de metal divalente y eluyendo al menos una proteína ácida de la resina de hidroxapatita con un regulador de elución que comprende fosfato.

En al menos algunas realizaciones de la invención, las impurezas son agregados de alto peso molecular, y en al menos una realización, el procedimiento de la invención da como resultado una reducción de al menos aproximadamente el 60% en agregados de alto peso molecular. En otras realizaciones de la invención, el procedimiento da como resultado una reducción de al menos aproximadamente el 90% en agregados de alto peso molecular. En realizaciones adicionales de la invención, las impurezas son proteína A y/o proteínas de la célula huésped.

En al menos algunas realizaciones, el regulador de equilibrio comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM del catión de metal divalente, el regulador de carga comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM del catión de metal divalente, el regulador de lavado comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mM del catión de metal divalente, y el regulador de elución comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 mM de fosfato. En otra realización, el regulador de elución comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mM de fosfato, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mM de fosfato o de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mM de fosfato. En una realización, el regulador de equilibrio, el regulador de carga y el regulador de lavado comprenden aproximadamente 5 mM del catión de metal divalente, y el regulador de elución comprende aproximadamente 6 mM de fosfato. En una realización, el regulador de carga comprende un catión monovalente, tal como NaCl o KCl. En algunas realizaciones, el catión de metal divalente es CaCl_2 o MgCl_2 , y en una realización, el catión de metal divalente es CaCl_2 . En al menos algunas realizaciones, el fosfato es fosfato de sodio o fosfato de potasio, y en una realización, el fosfato es fosfato de sodio.

En algunas realizaciones de la invención, el regulador de equilibrio, el regulador de lavado y/o el regulador de elución comprenden además de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM de HEPES, por ejemplo, aproximadamente 10 mM de HEPES. En al menos algunas otras realizaciones, el regulador de equilibrio, el regulador de lavado y/o el regulador de elución tienen un pH de aproximadamente 6,1 a aproximadamente 8,1, por ejemplo, un pH de aproximadamente 7,2.

En algunas realizaciones de la invención, la proteína ácida purificada es una proteína de fusión con inmunoglobulina, por ejemplo, proteína de fusión al receptor. En una realización de la invención, la proteína de fusión al receptor es

ActRIIB-Fc. En otra realización, la proteína de fusión es sIL21r-Fc.

En algunas realizaciones de la invención, la resina de hidroxiapatita es hidroxiapatita cerámica tipo I o tipo II. En al menos algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente, antes de la etapa de aplicar el regulador de equilibrio, la etapa de someter la preparación de proteína a un procedimiento de purificación seleccionado del grupo que consiste en cromatografía de proteína A, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad de metales inmovilizados, cromatografía de exclusión por tamaño, diafiltración, ultrafiltración, filtración de eliminación viral, cromatografía de intercambio iónico y combinaciones de las mismas.

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un cromatograma de un ejemplo de una ronda por una columna de cHA cargada con CaCl₂.

La Figura 2 es un cromatograma de cHA para la purificación de una proteína de fusión ácida a Ig (sIL21rFc).

15 Descripción detallada de la invención

Proteínas de la invención

Las proteínas a purificar usando los procedimientos de la invención son preferiblemente proteínas ácidas, por ejemplo, proteínas de fusión, proteínas de fusión de receptores, proteínas de fusión de inmunoglobulina, proteínas de fusión de receptores solubles y otros productos polipeptídicos.

Como se usa en el presente documento, las frases "polipéptido" o "producto polipeptídico" son sinónimos de los términos "proteína" y "producto proteico", respectivamente, y, como se entiende en general en la técnica, se refieren a al menos una cadena de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos secuenciales. En ciertas realizaciones, una "proteína de interés" o un "polipéptido de interés" o similar es una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico exógena que se ha transfectado o transformado en una célula huésped, por ejemplo, transfectada o transformada de forma transitoria o estable en una célula huésped. En ciertas realizaciones, en las que un ADN exógeno con el que la célula huésped ha sido transfectada o transformada codifica la "proteína de interés", la secuencia de ácido nucleico del ADN exógeno determina la secuencia de los aminoácidos. Esta secuencia puede ser una secuencia que se presenta en la naturaleza, o alternativamente puede ser una secuencia modificada por el hombre. En ciertas realizaciones, una "proteína de interés" es una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico que es endógena a la célula huésped o al organismo huésped.

En una realización preferida de la invención, la proteína de interés es una proteína ácida. Las proteínas ácidas son proteínas que portan una carga negativa a un pH neutro y poseen un punto isoeléctrico ácido (pI). Comúnmente, las proteínas ácidas tienen un mayor contenido de aminoácidos ácidos, tales como el ácido aspártico y glutámico. Debido a su carga negativa a pH neutro, las proteínas ácidas muestran distintas propiedades de unión, por ejemplo, distintas propiedades en aplicaciones cromatográficas.

En algunas realizaciones de la invención, la proteína de interés es una proteína de fusión. En algunas realizaciones de la invención, la proteína de fusión es una proteína de fusión a Ig, tal como una proteína de fusión al receptor. En otras realizaciones, la proteína de fusión es una proteína de fusión soluble, por ejemplo, una proteína de fusión al receptor soluble.

Las proteínas de fusión, por ejemplo, las proteínas de fusión al receptor, pueden producirse de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. En una realización de la invención, una proteína de fusión comprende dos restos polipeptídicos. Por ejemplo, para una proteína de fusión al receptor soluble, el primer resto comprende un receptor de longitud completa; alternativamente, el primer resto comprende menos que la longitud completa del receptor, por ejemplo, una porción extracelular del receptor. El receptor soluble también puede comprender un polipéptido adicional (un segundo resto), por ejemplo, una secuencia de polipéptido GST, Lex-A, MBP o una cadena de inmunoglobulina, que incluye, por ejemplo, un fragmento Fc, una región constante de la cadena pesada de los diversos isotipos, incluyendo: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE. En una realización de la invención, una proteína de fusión al receptor soluble es una proteína ActRIIB-Fc. En otra realización, la proteína de fusión es sIL21r-Fc.

En algunas realizaciones, el segundo resto de una proteína de fusión puede ser una inmunoglobulina o un fragmento de la misma (por ejemplo, un fragmento de unión a Fc de la misma). Por lo tanto, los términos "proteína de fusión a inmunoglobulina", "proteína de fusión a Ig", "proteína de fusión a Fc" y similares se refieren a una proteína de interés en la que el primer resto (es decir, el resto que comprende el polipéptido de interés) se fusiona a una inmunoglobulina o un fragmento de la misma. Los polipéptidos de fusión a inmunoglobulina son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N° 5.516.964; 5,225,538; 5,428,130; 5,514.582; 5,714,147; y 5.455.165.

En algunas realizaciones, el segundo resto polipeptídico comprende un polipéptido de inmunoglobulina de longitud completa. Alternativamente, el segundo resto de polipéptido comprende menos de la longitud completa del

polipéptido de inmunoglobulina, por ejemplo, una cadena pesada, cadena ligera, Fab, Fab₂, Fv o Fc. El segundo resto de polipéptido puede incluir la cadena pesada de un polipéptido de inmunoglobulina. El segundo resto polipeptídico también puede incluir la región Fc de un polipéptido de inmunoglobulina.

5 En algunas realizaciones, el segundo resto polipeptídico tiene menos función efectora que la función efectora de una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina de tipo silvestre. La función efectora de Fc incluye, por ejemplo, la unión al receptor de Fc, la fijación del complemento y la actividad de agotamiento de las células T (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.136.310). Los procedimientos para ensayar la actividad de agotamiento de células T, la función efectora de Fc y la estabilidad del anticuerpo son conocidos en la técnica. En una realización, el segundo resto de polipéptido tiene baja o ninguna afinidad por el receptor de Fc. En una realización alternativa, el segundo resto polipeptídico tiene una afinidad baja o nula por la proteína del complemento C1q.

15 Las proteínas de fusión, por ejemplo, proteínas de fusión solubles al receptor, pueden incluir adicionalmente una secuencia enlazadora que une el receptor soluble o un fragmento del mismo al segundo resto. Por ejemplo, la proteína de fusión puede incluir un enlazador peptídico, por ejemplo, un enlazador peptídico de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 aminoácidos de longitud.

20 En otra realización, la proteína de fusión puede incluir una secuencia señal heteróloga en su N-terminal. En ciertas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamífero), la expresión y/o la secreción de la proteína de fusión, por ejemplo, la proteína de fusión al receptor soluble, puede incrementarse mediante el uso de una secuencia señal heteróloga. Un ejemplo de un péptido señal que puede incluirse en la proteína de fusión es MKFLVNVVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 1).

25 Una proteína quimérica o de fusión de la invención se puede producir mediante técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican para las diferentes secuencias polipeptídicas se ligan juntos en el marco de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, empleando terminales de extremo romo o de extremo escalonado para ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los terminales apropiados, rellenando de extremos cohesivos, según corresponda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y ligación enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente pueden ser hibridados y amplificados nuevamente para generar una secuencia de genes quiméricos (véase, por ejemplo, Ausubel et al. (Eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Además, muchos vectores de expresión que codifican un resto de fusión (por ejemplo, una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina) están comercialmente disponibles.

40 Una proteína de interés, por ejemplo, una proteína ácida, puede producirse mediante la expresión en una serie de líneas celulares que pueden actuar como células huésped adecuadas. Por ejemplo, tales células pueden ser células animales. La frase "células animales" abarca invertebrados, vertebrados no mamíferos (por ejemplo, aves, reptiles y anfibios) y células de mamíferos. Los ejemplos no limitativos de células de invertebrados incluyen las siguientes células de insecto: *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori* (gusano de seda / polilla de seda). Los polipéptidos de interés pueden producirse de forma recombinante uniando operativamente los polinucleótidos aislados de interés a secuencias de control adecuadas en uno o más vectores de expresión de insectos, tales como vectores de baculovirus, y empleando un sistema de expresión de células de insectos. Los materiales y procedimientos para los sistemas de expresión de baculovirus / Sf9 están disponibles comercialmente en forma de kit (por ejemplo, el kit MaxBac®, Invitrogen, Carlsbad, CA).

55 En las realizaciones preferidas, las células huésped son células de mamífero. Una cantidad de líneas celulares de mamífero son células huésped adecuadas para la expresión recombinante de la proteína de interés. Las líneas de células huésped de mamíferos incluyen, por ejemplo, COS, PER.C6, TM4, VERO076, MDCK, BRL-3A, W138, Hep G2, MMT, MRC 5, FS4, CHO, 293T, A431, 3T3, CV-1, C3H10T1/2, Colo205, 293, HeLa, células L, BHK, HL-60, FRhL-2, U937, HaK, células Jurkat, Rat2, BaF3, 32D, FDCP-1, PC12, M1x, mielomas murinos (por ejemplo, SP2/0 y NS0) y células C2C12, así como líneas celulares de primates transformados, hibridomas, células diploides normales y cepas celulares derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario y explantes primarios. Numerosas líneas celulares están disponibles a través de fuentes comerciales, tales como la American Type Culture Collection (ATCC). En una realización de la invención, la proteína de interés se expresa en células huésped CHO.

60 Alternativamente, puede ser posible producir en forma recombinante los polipéptidos de interés en eucariotas inferiores tales como levadura o en procariotas. Las cepas de levadura potencialmente adecuadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas de *Kluyveromyces* y cepas de *Candida*. Las cepas bacterianas potencialmente adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhimurium*. Si los polipéptidos de interés se producen en levaduras o bacterias, puede ser necesario modificarlas, por ejemplo, por

fosforilación o glicosilación de los sitios apropiados, para obtener la funcionalidad adecuada. Dichas uniones covalentes se pueden lograr usando procedimientos químicos o enzimáticos bien conocidos.

La expresión en bacterias puede dar como resultado la formación de cuerpos de inclusión que incorporan la proteína recombinante. Por lo tanto, el replegamiento de la proteína recombinante puede ser necesario para producir un material activo o más activo. En la técnica se conocen varios procedimientos para obtener proteínas heterólogas plegadas correctamente a partir de cuerpos de inclusión bacterianos. Estos procedimientos generalmente implican solubilizar la proteína de los cuerpos de inclusión, luego desnaturalizar la proteína completamente usando un agente caotrópico. Cuando los residuos de cisteína están presentes en la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína, a menudo es necesario realizar el replegamiento en un entorno que permita la correcta formación de enlaces disulfuro (un sistema redox). Los procedimientos generales de replegamiento se describen por Kohno (1990) Meth. Enzymol. 185: 187-95. El documento EP 0433225 y la patente de Estados Unidos N° 5.399.677 describen otros procedimientos apropiados.

15 Resina de cromatografía de hidroxiapatita

Después de la expresión de la proteína de interés en las células huésped, se purifica la proteína de interés, por ejemplo, la proteína ácida. La proteína de interés se puede purificar a partir de extractos celulares de una línea celular huésped que expresa la proteína de interés o medio acondicionado (medio de recolección) derivado del cultivo de una línea celular huésped recombinante que expresa la proteína de interés. Además, la proteína de interés se puede purificar a partir de una serie de otras fuentes que incluyen, entre otras, suero de animales, líquido ascítico, extractos de órganos, etc. Procedimientos comunes de purificación de proteínas, tal como cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño y la cromatografía de interacción hidrófoba no logran eliminar los componentes no deseados de las preparaciones de proteínas, como los agregados de alto peso molecular o las especies inactivas y/o parcialmente activas. Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención utiliza resina de hidroxiapatita para la purificación de proteínas de interés, por ejemplo, una proteína ácida.

El término "agregados de alto peso molecular" o "HMWA" se refiere a una asociación de al menos dos proteínas de interés. La asociación puede surgir por cualquier procedimiento que incluya, pero no se limita a, entrecruzamiento covalente, no covalente, disulfuro o no reducible. "Agregado de alto peso molecular" puede ser una asociación entre al menos dos de las mismas proteínas y/o una asociación entre la proteína de interés y otras proteínas encontradas en el cultivo celular, por ejemplo, proteínas de la célula huésped.

Las "especies inactivas" y las "especies parcialmente activas" de la proteína de interés son proteínas que tienen la misma secuencia de aminoácidos y peso molecular que la proteína de interés, pero que presentan una capacidad de unión no significativa o significativamente menor, respectivamente, al objetivo. Una capacidad de unión al objetivo significativamente más baja, como se usa en este documento, se refiere a al menos aproximadamente el 10%, 20% o 30% de reducción, preferiblemente al menos aproximadamente 40% de reducción, en la capacidad de unión de las especies de proteínas parcialmente activas en comparación con la proteína activa. "Especies inactivas" y "especies parcialmente activas" también se refieren a proteínas que tienen la misma secuencia de aminoácidos y peso molecular que la proteína de interés, pero que muestran una actividad nula o significativamente menor, respectivamente, que la proteína activa. Una actividad significativamente menor, como se usa en el presente documento, se refiere a al menos aproximadamente el 30% de reducción, preferiblemente al menos aproximadamente el 40% de reducción, en la actividad de las especies de proteínas parcialmente activas en comparación con la proteína activa. El porcentaje de reducción en la capacidad de unión y/o actividad se puede medir, por ejemplo, comparando la capacidad de unión y/o la actividad de la proteína en la elución máxima con la de la proteína en la fracción eliminada.

En el procedimiento de la presente invención, las impurezas, por ejemplo, agregados de alto peso molecular, y especies inactivas y/o parcialmente activas de la proteína de interés se separan con éxito de la proteína activa de interés, por ejemplo, una proteína ácida, usando procedimiento de cromatografía de hidroxiapatita cHA.

En el mercado están disponibles diversas resinas cromatográficas de hidroxiapatita, y se puede usar cualquier forma disponible del material en la práctica de esta invención. En una realización de la invención, la hidroxiapatita está en forma cristalina. Las hidroxiapatitas para uso en esta invención pueden ser aquellas que se aglomeran para formar partículas y se sinterizan a altas temperaturas en una masa cerámica porosa estable.

Sin embargo, en una realización preferida, la hidroxiapatita es hidroxiapatita cerámica. "Hidroxiapatita cerámica" o "cHA" se refiere a un fosfato de calcio hidroxilado insoluble de fórmula $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, que se ha sinterizado a altas temperaturas en una forma cerámica esférica macroporosa. El término "cHA" abarca, pero no se limita a, hidroxiapatita cerámica tipo I y tipo II. A menos que se especifique, "cHA" se refiere a cualquier tamaño de partícula que incluye, entre otros, 20, 40 y 80 μm .

El tamaño de partícula de la hidroxiapatita puede variar ampliamente, pero un tamaño de partícula típico varía de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 1.000 μm de diámetro, y puede ser de aproximadamente 10 μm a

aproximadamente 100 μm . En una realización de la invención, el tamaño de partícula es de aproximadamente 20 μm . En otra realización de la invención, el tamaño de partícula es de aproximadamente 40 μm . En otra realización más de la invención, el tamaño de partícula es de aproximadamente 80 μm .

5 Se pueden emplear varios soportes cromatográficos en la preparación de columnas de cHA, los más utilizados son la hidroxiapatita de tipo I y tipo II. El tipo I tiene una alta capacidad de unión a proteínas y una mejor capacidad para las proteínas ácidas. El tipo II, sin embargo, tiene una menor capacidad de unión a proteínas, pero tiene una mejor resolución de los ácidos nucleicos y ciertas proteínas. El material tipo II también tiene una afinidad muy baja por la albúmina y es especialmente adecuado para la purificación de muchas especies y clases de inmunoglobulinas. La elección de un tipo particular de hidroxiapatita puede ser determinada por el experto en la materia.

15 La presente invención se puede usar con resina de hidroxiapatita que está suelta, empaquetada en una columna o en un cromatógrafo anual continuo. En una realización de la invención, la resina de hidroxiapatita cerámica se empaqueta en una columna. La elección de las dimensiones de la columna puede ser determinada por el experto en la materia. En una realización de la invención, se puede usar un diámetro de columna de al menos aproximadamente 0,5 cm con una altura de lecho de aproximadamente 20 cm para la purificación a pequeña escala. En una realización adicional de la invención, se puede usar un diámetro de columna de aproximadamente 35 cm a aproximadamente 60 cm. En otra realización más de la invención, se puede usar un diámetro de columna de aproximadamente 60 cm a aproximadamente 85 cm. En ciertas realizaciones de la invención, se puede usar una suspensión de resina de hidroxiapatita cerámica en una solución de Na_2HPO_4 de aproximadamente 200 mM a un pH de aproximadamente 9,0 para empacar la columna a una velocidad de flujo constante de aproximadamente 4 cm/min o con la gravedad.

Procedimiento de purificación por cromatografía de hidroxiapatita

25 En el procedimiento de la presente invención, la proteína de interés, por ejemplo, una proteína ácida, por ejemplo, una proteína ácida de fusión a inmunoglobulina, se purifica a partir de impurezas, tal como HMWA, y especies inactivas y/o parcialmente activas, utilizando cromatografía cHA en modo de unión.

30 El "modo de unión" se refiere a una técnica de separación de la preparación de proteínas en la que al menos una proteína contenida en la preparación se une a una resina o soporte cromatográfico, mientras que al menos un contaminante o impureza fluye a través de ella. El modo de unión puede usarse, por ejemplo, en cromatografía de hidroxiapatita y cromatografía de intercambio iónico.

35 El presente procedimiento utiliza un soporte de cHA cargado con una solución de metal divalente, por ejemplo, solución de catión divalente, a un pH neutro y baja fuerza iónica. Por ejemplo, las soluciones de cationes divalentes pueden ser soluciones de MgCl_2 o CaCl_2 . Una columna con carga catiónica de metal divalente es particularmente útil para inmovilizar proteínas ácidas de interés porque es capaz de fortalecer la unión de proteínas ácidas a cHA debido a la formación de puentes adicionales entre los carboxilos de las proteínas y los sitios de fosfato de la columna. Gorbunoff (1985) Procedimientos Enzymol. 182: 329-39.

45 En una realización preferida de la invención, la solución de catión divalente usada para cargar la columna es una solución de CaCl_2 . Dichas columnas cargadas con CaCl_2 son capaces de unirse a la proteína de interés, especies inactivas y parcialmente activas, y HMWA. Por ejemplo, la columna de cHA se puede cargar al equilibrar la columna con un regulador de equilibrio que comprende una solución de CaCl_2 de baja fuerza iónica. Por ejemplo, la solución de CaCl_2 puede ser de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, preferiblemente de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 10 mM de CaCl_2 . En una realización de la invención, la solución de CaCl_2 es de aproximadamente 5 mM. El regulador de equilibrio puede comprender además HEPES de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM, preferiblemente HEPES hasta aproximadamente 50 mM, lo más preferiblemente de aproximadamente HEPES 10 mM. En lugar de HEPES, el regulador de equilibrio puede contener cualquier otro disolvente con capacidad de regulación. El pH de la solución de equilibrio que contiene CaCl_2 puede variar desde un pH ligeramente básico hasta un pH ligeramente ácido. Por ejemplo, el pH del regulador de equilibrio puede variar de aproximadamente 6,1 a aproximadamente 8,1, preferiblemente el pH del regulador de equilibrio es de aproximadamente 7,2.

55 Opcionalmente, antes de cargar la columna con un regulador de equilibrio que comprende la solución de catión divalente, por ejemplo, CaCl_2 o MgCl_2 , la columna se puede equilibrar en dos etapas aplicando primero una solución de equilibrio que comprende de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,5 mM de una solución de fosfato y aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 2,0 mM de una solución salina en un pH ligeramente básico hasta ligeramente ácido. En una realización, se usan aproximadamente 0,3 M de fosfato de sodio y aproximadamente 1,0 M de NaCl , a un pH de aproximadamente 6,8. Un experto en la técnica entenderá que las soluciones de fosfato y sal y el pH utilizado para la primera etapa de equilibrio variarán dependiendo de la proteína de interés. En una segunda etapa de equilibrio, el regulador de equilibrio puede comprender de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM de regulador, tal como hasta aproximadamente 50 mM de HEPES, lo más preferiblemente de aproximadamente 10 mM de HEPES, a un pH ligeramente básico a ligeramente ácido, tal como el pH de aproximadamente 6,1 a aproximadamente 8,1, preferiblemente aproximadamente 7,2, o cualquier otro disolvente

con capacidad de regulación.

En un procedimiento de la presente invención, después de cargar la columna con una solución de catión de metal divalente, por ejemplo, una solución de CaCl_2 , la columna puede cargarse con el regulador de carga que contiene la proteína de interés. El regulador de carga puede ser cualquier regulador, por ejemplo, un regulador de una etapa de purificación previa, tal como la etapa de purificación de proteína A, enriquecida con un catión de metal divalente. Alternativamente, la proteína de interés puede intercambiarse en un regulador de carga que contiene un catión de metal divalente. Alternativamente, la proteína de interés puede cargarse directamente en la columna, sin la adición de un catión divalente directamente al regulador de carga. Más particularmente, el regulador de carga puede comprender un catión monovalente, tal como NaCl . Preferiblemente, para la purificación de sIL21r-Fc, no se añade un catión divalente al regulador de carga. En otra realización de la invención, la preparación de la proteína de interés puede enriquecerse o intercambiarse en un regulador de carga que comprende de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM de un catión metálico monovalente o divalente, tal como aproximadamente 2 mM de CaCl_2 . En otra realización de la invención, la preparación de la proteína de interés puede enriquecerse con aproximadamente 5 mM de CaCl_2 .

Posteriormente a la carga de la columna con el regulador de carga que contiene la proteína de interés, la columna se lava con un regulador de lavado del mismo pH y que comprende el mismo catión de metal divalente a aproximadamente la misma concentración que la solución de equilibrio utilizada para cargar el columna. La etapa de lavado se realiza con el fin de eliminar las impurezas poco ligadas. Por lo tanto, el regulador de lavado puede comprender de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM de CaCl_2 , preferiblemente de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 10 mM de CaCl_2 , lo más preferiblemente de aproximadamente 5 mM de CaCl_2 . El regulador de lavado puede comprender además de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM de HEPES, preferiblemente hasta aproximadamente 50 mM de HEPES, lo más preferiblemente de aproximadamente 10 mM de HEPES. En lugar de HEPES, el regulador de lavado puede contener cualquier otro disolvente con capacidad de regulación. En una realización, el regulador de lavado es una solución que comprende aproximadamente 5 mM de CaCl_2 y aproximadamente 10 mM de HEPES, a un pH de aproximadamente 7,2. Posteriormente, la columna se puede lavar con otro regulador, por ejemplo, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM de regulador HEPES, preferiblemente hasta aproximadamente 50 mM de HEPES, lo más preferiblemente de aproximadamente 10 mM de regulador HEPES, para eliminar cualquier CaCl_2 libre. El pH del segundo regulador de lavado puede ser de aproximadamente 6,1 a aproximadamente 8,1, preferiblemente de aproximadamente 7,2.

Después del lavado, la proteína de interés se eluye con un regulador de elución que contiene fosfato, por ejemplo, un regulador que contiene fosfato de sodio o un regulador que contiene fosfato de potasio. Por ejemplo, el regulador de elución puede contener de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM de regulador fosfato. En una realización preferida de la invención, el regulador de elución que contiene fosfato es de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 10 mM de regulador de fosfato de sodio, tal como aproximadamente 6 mM de regulador de fosfato de sodio. El regulador de elución puede comprender además de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 mM de HEPES, preferiblemente hasta aproximadamente 50 mM de HEPES, lo más preferiblemente de aproximadamente 10 mM de HEPES. En lugar de HEPES, el regulador de elución puede contener cualquier otro disolvente con capacidad de regulación. El pH del regulador de elución puede variar desde un pH ligeramente básico hasta un pH ligeramente ácido. Por ejemplo, el pH del regulador de elución puede variar de aproximadamente 6,1 a aproximadamente 8,1, preferiblemente el pH del regulador de equilibrio es de aproximadamente 7,2.

Después de la elución de la proteína de interés, el HMWA y las especies inactivas y/o parcialmente activas se eluyen opcionalmente posteriormente de la resina.

Además, la columna puede limpiarse opcionalmente, es decir, eliminarse y regenerarse, después de la elución de la proteína de interés. Este procedimiento generalmente se realiza regularmente para minimizar la acumulación de impurezas en la superficie de la fase sólida y/o esterilizar la matriz para evitar la contaminación del producto con microorganismos. La resina se extrae comúnmente con un fosfato de sodio y una solución salina, tal como aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,5 mM de fosfato de sodio y aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 2,0 M de NaCl , tal como aproximadamente 0,3 M de fosfato de sodio y aproximadamente 1,0 M NaCl ; a un pH entre ligeramente básico y ligeramente ácido, tal como un pH de alrededor de 6,8. La resina se regenera comúnmente usando una solución de hidróxido de sodio y fosfato de potasio.

Adicionalmente, la resina puede almacenarse opcionalmente entre rondas en un regulador de almacenamiento. Un regulador de almacenamiento es comúnmente un regulador de hidróxido de sodio, tal como un regulador de hidróxido de sodio de aproximadamente 100 mM.

Los ejemplos de componentes de todos los reguladores se muestran en la Tabla 1. Los componentes del regulador se pueden ajustar de acuerdo con el conocimiento del experto en la técnica. No todos los reguladores o etapas son necesarios, pero se proporcionan solo con fines ilustrativos. Por ejemplo, puede que no sea necesario realizar las etapas de equilibrio 1 y 2, y puede que no sea necesario eliminar, regenerar o almacenar la resina de hidroxipatita.

En el procedimiento de la presente invención, la proteína eluida de interés, por ejemplo, la proteína ácida eluida, comprende un nivel reducido de HMWA y especies inactivas y/o parcialmente activas. En una realización, un nivel de HMWA se reduce en al menos un 60%, preferiblemente en al menos un 80%, lo más preferiblemente en al menos un 90% (por ejemplo, de aproximadamente un 5% a aproximadamente un 15% en la carga a menos de aproximadamente 2% en el pico de elución). Se pueden usar varios procedimientos para medir el contenido de HMWA en proteínas eluidas, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC). Se puede usar un ensayo BIACORE (GE-Healthcare, Piscataway, NJ) y ensayos ELISA de actividad de unión para controlar la eliminación de las especies inactivas y/o parcialmente activas.

10 Etapas de purificación opcionales adicionales

Como se mencionó anteriormente, el procedimiento de purificación basado en cHA de la invención se puede usar en combinación con otras técnicas de purificación de proteínas. Es deseable para la cromatografía de cHA que los desafíos de la carga inicial sean menores o iguales a aproximadamente 40 mg/mL de resina de cHA, tal como aproximadamente 20 mg/mL de resina de cHA. Por lo tanto, en una realización de la invención, una o más etapas que preceden a la etapa de hidroxapatita pueden ser deseables para reducir el desafío de carga de los contaminantes o impurezas. En otra realización de la invención, una o más etapas de purificación que siguen a la etapa de hidroxapatita pueden ser deseables para eliminar contaminantes o impurezas adicionales.

20 El procedimiento de purificación de cHA descrito puede combinarse opcionalmente con otras etapas de purificación, que incluyen, entre otras, cromatografía de proteína A, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad con metales inmovilizados, cromatografía de exclusión por tamaño, diafiltración, ultrafiltración, filtración por eliminación viral y/o cromatografía de intercambio iónico.

25 En una realización, antes de la etapa de purificación de cHA, el medio de recolección para las proteínas de fusión a inmunoglobulina se puede purificar opcionalmente inicialmente mediante una etapa de cromatografía de Proteína A. Por ejemplo, puede emplearse de manera útil PROSEP-A (Millipore, RU), que consiste en la Proteína A acoplada covalentemente al vidrio de poro controlado. Otras formulaciones útiles de Proteína A incluyen Proteína A Sefarosa FAST FLOW (GE-Healthcare, Piscataway, NJ), Proteína A TOYOPEARL 650M (TosoHaas Co., Filadelfia, PA) y columnas MABSELECT (GE-Healthcare, Piscataway, NJ).

30 Como una etapa opcional antes de la purificación de cHA, puede emplearse una cromatografía de intercambio iónico. A este respecto, varios sustituyentes aniónicos o catiónicos pueden unirse a matrices para formar soportes aniónicos o catiónicos para cromatografía. Los sustituyentes de intercambio aniónico incluyen grupos dietilaminoetil (DEAE), trimetilaminoetil acrilamida (TMAE), aminoetil cuaternario (QAE) y amina cuaternaria (Q). Los sustituyentes de intercambio catiónico incluyen carboximetilo (CM), sulfoetil (SE), sulfopropilo (SP), fosfato (P) y sulfonato (S). Las resinas de intercambio iónico celulósicas tales como DE23, DE32, DE52, CM-23, CM-32 y CM-52 están disponibles a través de Whatman Ltd. Maidstone, Kent, RU. Se conocen también intercambiadores de iones entrecruzados basados en Sefadex. Por ejemplo, DEAE-Sefadex, QAE-Sefadex, CM-Sefadex y SP-Sephadex, y DEAE-Sefarosa, Q-Sefarosa, CM-Sefarosa y S-Sefarosa y Sefarosa están disponibles a través de Amersham Biosciences, Piscataway, NJ. Además, tanto el DEAE como el copolímero de etilenglicol-metacrilato derivado de CM tal como TOYOPEARL DEAE-650S o M y TOYOPEARL CM-650S o M están disponibles a través de Toso Haas Co., Filadelfia, PA.

45 En una realización de la invención, la cromatografía de intercambio iónico se puede usar en modo de unión o modo de flujo continuo.

En ciertas realizaciones, la etapa de cromatografía de Proteína A se realiza primero, la etapa de intercambio de iones se realiza en segundo lugar, y la etapa de cHA se lleva a cabo en tercer lugar.

50 Impurezas adicionales

Además de HMWA, la eliminación de especies inactivas y/o parcialmente activas, la cromatografía de cHA ha demostrado ser útil para eliminar otras impurezas de las preparaciones de proteínas. Otras impurezas que pueden eliminarse mediante los procedimientos de cromatografía de cHA de la invención incluyen, pero no se limitan a, ADN, proteína de la célula huésped, virus adventicios y contaminantes de la proteína A lixiviados de etapas de purificación anteriores.

60 En una realización de la invención, el procedimiento es capaz de eliminar la Proteína A lixiviada de la preparación de proteína. En ciertas realizaciones de esta invención, la cantidad de proteína A lixiviada presente en la preparación final puede reducirse significativamente, tal como desde aproximadamente 28 ppm hasta aproximadamente 1 ppm.

65 En otra realización de la invención, el procedimiento es capaz de eliminar la proteína de la célula huésped (HCP) de la preparación de proteína. En ciertas realizaciones de la invención, la cantidad de HCP en la preparación final se puede reducir de aproximadamente 7.500 ppm a aproximadamente 750 ppm. Se pueden usar los ensayos ELISA de HCP y Proteína A para controlar la eliminación de HCP y la Proteína A lixiviada.

Ejemplo

Los Ejemplos que siguen se exponen para ayudar en la comprensión de la invención, pero no pretenden, y no deben interpretarse, como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera. El Ejemplo no incluye descripciones detalladas de procedimientos convencionales, por ejemplo, clonación, transfección, aspectos básicos de procedimientos para la sobreexpresión de proteínas en líneas celulares, y procedimientos para llevar a cabo cualquier etapa de purificación preliminar adicional (como la cromatografía de Proteína A). Tales procedimientos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplo 1:

Se expresó una proteína de fusión ácida a inmunoglobulina, ActRIIB-Fc, en células CHO y se purificó a partir de los medios de recolección mediante cromatografía de rProteína A (GE-Healthcare, Piscataway, NJ). La elución de proteínas de la cromatografía de rProteína A, que contenía la proteína ActRIIB-Fc, también contenía un nivel significativo de especies inactivas y parcialmente activas y HMWA (ver fila "Carga" en la **Tabla 2**). Para eliminar las especies ActRIIB-Fc inactivas y parcialmente activas y HMWA, la elución de la columna de Proteína A se sometió a cromatografía de cHA.

La columna de cHA (BioRad Laboratories, Hercules, CA) se equilibró primero con el regulador de equilibrio 1, que contenía fosfato de sodio 0,3 M, NaCl 1,0 M, pH 6,8, seguido del regulador de equilibrio 2, que contenía HEPES 10 mM, pH 7,2 (**Tabla 1**). El Regulador de Equilibrio 1 es un regulador con una alta concentración de fosfato y el Regulador de Equilibrio 2 se utiliza para lavar el fosfato. La columna se equilibró posteriormente con una solución de cloruro de calcio a pH neutro y baja fuerza iónica (Regulador de Equilibrio 3, que contenía CaCl₂ 5 mM y HEPES 10 mM, pH 7,2) para preparar la columna para la carga. La reunión de eluato de la rProteína A se ajustó para contener cloruro de calcio 5 mM (Carga) y se cargó en la columna de cHA. Bajo la condición de regulador de carga, tanto el producto, las impurezas relacionadas con el producto (especies inactivas y parcialmente activas y HMWA), y las impurezas derivadas del proceso (proteína A lixiviada, proteínas de la célula huésped y ADN) se unieron a la resina de cHA. La columna se lavó luego con un regulador de cloruro de calcio (Lavado 1), seguido de un segundo regulador de lavado (Lavado 2) para eliminar el cloruro de calcio, y el producto activo, es decir, ActRIIB-Fc activa, se eluyó selectivamente usando fosfato de sodio 6 mM y regulador HEPES 10 mM a pH neutro de 7,2 (Elución). Las impurezas relacionadas con el producto, incluidas las especies inactivas y parcialmente activas y las especies de HMWA, se eliminaron posteriormente de la resina utilizando una mayor concentración de regulador de fosfato. Finalmente, la resina se regeneró utilizando una solución de hidróxido de sodio y fosfato de potasio.

Tabla 1: Lista de reguladores para la etapa de cHA

Regulador	Composición
Regulador de equilibrio 1	Fosfato de sodio 0,3 M, NaCl 1,0 M, pH 6,8
Regulador de equilibrio 2	HEPES 10 mM, pH 7,2
Regulador de equilibrio 3	CaCl ₂ 5 mM, HEPES 10 mM, pH 7,2
Carga	Regulador que contiene proteína de interés, CaCl ₂ 5 mM
Lavado 1	CaCl ₂ 5 mM, HEPES 10 mM, pH 7,2
Lavado 2	HEPES 10 mM, pH 7,2
Elución	Fosfato de sodio 6 mM, HEPES 10 mM, pH 7,2
Eliminación	Fosfato de sodio 0,3 M, NaCl 1,0 M, pH 6,8
Regeneración	Fosfato de potasio 0,5 M, NaOH 1,0 M
Almacenamiento	NaOH 100 mM

La **Figura 1** muestra un cromatograma de la ronda en la columna de cHA. La mayoría del producto de interés se eluye en la fracción de elución, mientras que la fracción para eliminación contiene tanto las especies inactivas como las parcialmente activas (monómero) y el HMWA.

Los resultados de la eliminación de impurezas mediante la etapa cromatográfica de cHA en las condiciones operativas definidas se enumeran en la **Tabla 2**. El ensayo BEACORE (GE-Healthcare, Piscataway, NJ) se usó para controlar la eliminación de especies inactivas y parcialmente activas, SEC-HPLC Waters Corporation, Milford, MA) se usó para medir el contenido de HMWA, y se utilizaron los ensayos de proteína A de la célula huésped (HCP) y ELISA de proteína A para controlar la eliminación de HCP y la proteína A lixiviada. Se aisló el monómero en la fracción de carga y eliminación de HMWA y luego se analizó por el ensayo BIACORE para determinar la actividad de unión. Como se muestra en la **Tabla 2**, el producto de interés en la fracción de elución tiene una actividad de unión mucho más alta que las especies inactivas y parcialmente activas presentes en lo reunido para eliminación. La etapa

de cHA se realizó a escala de fabricación piloto y clínica. Los datos generados a partir de las rondas en columnas de cHA a gran escala se muestran en la Tabla 3

Tabla 2: Resultados de la eliminación de impurezas de una ronda de columna de cHA cargada con CaCl₂

	Actividad de unión por BIACORE ^{MR} (RU)	Actividad relativa (%)	HCP (ppm)	Proteína A lixiviada (ppm)	%de HMWA
Carga	No analizada (NT)	NA	7500	28	5
Reunión de picos	62	100	748	1,2	0,24
Reunión de lo eliminado	36	58	NT	NT	14.5

5

Tabla 3: Resultados de la eliminación de impurezas de una columna de cHA cargada con CaCl₂ en una operación a gran escala

Muestras	Rmáx (RU)	Actividad relativa (%)	HCP (ppm)	Proteína A lixiviada (ppm)	% de HMWA
Lote 1-carga	61	94	4.867	12	4,9
Lote 1-Pico	65	100	1.044	0.6	0,3
Lote 1-Eliminado	55	85	NT	NT	NT
Lote 2-carga	62	94	5.840	5	3,9
Lote 2-Pico	66	100	1015	0.7	0,8
Lote 2-Eliminado	56	85	NT	NT	NT
Lote 3-carga	60	94	2.006	14	3,9
Lote 3-Pico	64	100	273	2	0,4
Lote 3-Eliminado	50	78	4.071	36	NT
Lote 4-Load	60	92	2.969	16	4,1
Lote 4-Pico	65	100	289	3	0,4
Lote 4-Eliminado	48	74	4.239	38	NT

Ejemplo 2

Se encontró que la cromatografía de cHA es superior para la eliminación de HMWA durante la purificación de otra proteína de fusión ácida a Ig que comprende IL21 fusionada con el dominio Fc de Ig (sIL21r-Fc). Véase Ettinger et al., Ann Rheum Dis 2008; 67 (Suplemento III): iii83-iii86 (para una descripción de la proteína de fusión sIL21r-Fc). Uno de los objetivos de esta etapa del proceso fue eliminar HMWA para mejorar la capacidad de la etapa cromatográfica posterior para HMWA y HCP. La columna se equilibró con una solución de cloruro de calcio a pH neutro y baja fuerza iónica. La reunión del eluato de rProteína A no se enriqueció con cloruro de calcio para este proceso debido a la inestabilidad del producto observada tras la exposición al cloruro de calcio, sino que más bien, la reunión de eluato de rProteína A se cargó directamente en la columna de cHA con un desafío de carga de resina de 20-30 g/L. Bajo estas condiciones de regulador, el producto se unió a la resina de cHA, con algunas especies de HMWA que fluyen a través de la columna. La columna se lavó luego con un pH neutro y un regulador de baja fuerza iónica y el producto activo se eluyó selectivamente usando un regulador de fosfato 10-17 mM a un pH neutro. Las especies adicionales de HMWA se eliminaron posteriormente de la resina utilizando una mayor concentración de regulador de fosfato. Finalmente, la resina se regeneró utilizando una solución de hidróxido de sodio y fosfato de potasio.

25

Tabla 3: Lista de reguladores para la etapa de purificación por cHA de sIL21r-Fc (Fig. 2)

Regulador	Composición
Equilibrio 1	Fosfato de potasio 1 M, pH 7,2
Equilibrio 2	HEPES 50 mM, NaCl 200 mM, pH 7

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para purificar al menos una proteína ácida de interés a partir de una preparación de proteínas que contiene impurezas, que comprende:
- 5 (a) aplicar un regulador de equilibrio que comprende CaCl_2 a resina de hidroxiapatita;
 (b) poner en contacto la resina de hidroxiapatita con la preparación de proteínas en un regulador de carga;
 (c) lavar la resina de hidroxiapatita con un regulador de lavado que comprende CaCl_2 ; y
 10 (d) eluir al menos una proteína ácida de la resina de hidroxiapatita con un regulador de elución que comprende fosfato 2 a 50 mM.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el regulador de equilibrio comprende de 1 a 20 mM de CaCl_2 , el regulador de carga comprende de 1 a 20 mM de CaCl_2 , el regulador de lavado comprende de 1 a 20 mM de CaCl_2 .
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el regulador de equilibrio, el regulador de carga y el regulador de lavado comprenden 5 mM del CaCl_2 , y el regulador de elución comprende 6 mM de fosfato.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que las impurezas son especies inactivas o parcialmente activas de al menos una proteína ácida.
- 20 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que las impurezas son agregados de alto peso molecular.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la resina de hidroxiapatita es hidroxiapatita cerámica tipo I o tipo II.
- 25 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el fosfato es fosfato de sodio o fosfato de potasio.
- 30 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el fosfato es fosfato de sodio.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que al menos uno del regulador de equilibrio, el regulador de lavado o el regulador de elución comprenden además 10 mM a 200 mM de HEPES.
- 35 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que al menos uno del regulador de equilibrio, el regulador de lavado o el regulador de elución comprenden además HEPES 10 mM.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que al menos uno del regulador de equilibrio, el regulador de lavado o el regulador de elución tienen un pH de 6,1 a 8,1.
- 40 12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que al menos uno del regulador de equilibrio, el regulador de lavado o el regulador de elución tienen un pH de 7,2.
13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la proteína ácida es una proteína de fusión a inmunoglobulina.
- 45 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la proteína de fusión a inmunoglobulina es una proteína de fusión al receptor.
- 50 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la proteína de fusión al receptor es ActRIIB-Fc.
16. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la proteína de fusión es sIL21 r-Fc.
17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el regulador de carga comprende un catión monovalente.
- 55 18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el catión monovalente es NaCl.
19. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el procedimiento da como resultado una reducción de al menos 60% en agregados de alto peso molecular.
- 60 20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que el procedimiento da como resultado una reducción de al menos un 90% en agregados de alto peso molecular.
21. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en el que las impurezas son proteína A o proteínas de la célula huésped.
- 65

22. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en el que el procedimiento comprende además, antes de la etapa de aplicar el regulador de equilibrio, la etapa de someter la preparación de proteína a un procedimiento de purificación seleccionado del grupo que consiste en cromatografía de Proteína A, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad de metales inmovilizados, cromatografía de exclusión por tamaño, diafiltración, ultrafiltración, filtración de eliminación viral, cromatografía de intercambio iónico y combinaciones de las mismas.
- 5

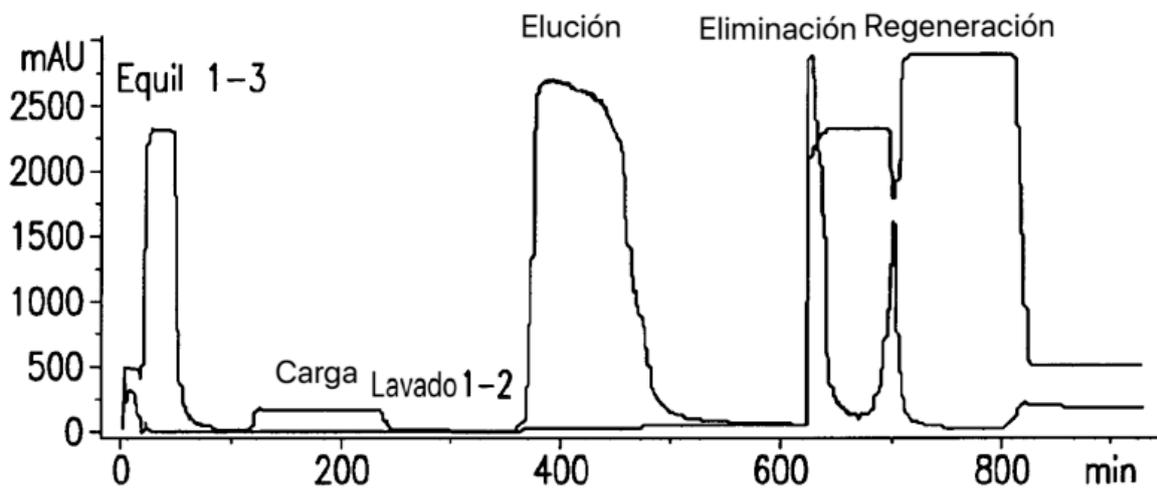


FIG. 1

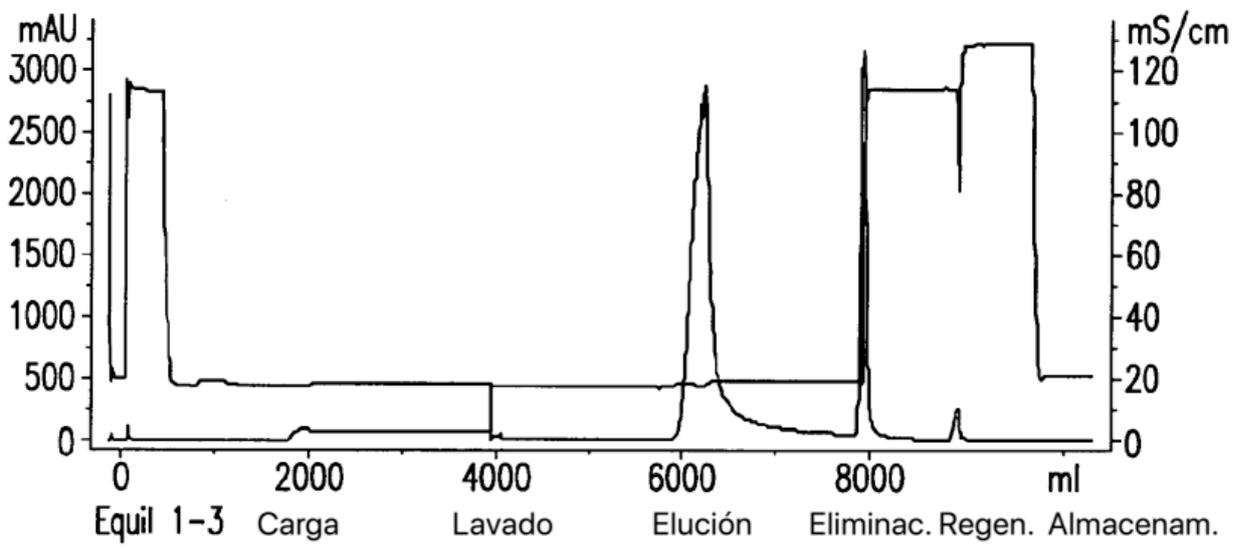


FIG.2