

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 933**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2012 PCT/EP2012/070259**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13053888**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2012 E 12770497 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2748180**

54 Título: **Purificación de proteínas mediante cromatografía de intercambio aniónico**

30 Prioridad:

14.10.2011 US 201161547513 P

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

20.02.2019

73 Titular/es:

BAXALTA GMBH (50.0%)

Zählerweg 4

6300 Zug, CH y

BAXALTA INCORPORATED (50.0%)

72 Inventor/es:

MITTERER, ARTUR;

HASSLACHER, MEINHARD y

FIEDLER, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 700 933 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 mediante cromatografía de intercambio aniónico

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de dos etapas para la purificación de proteínas de unión a cationes divalentes con alto rendimiento y alta pureza en materiales de resina de intercambio aniónico.

10 Antecedentes de la invención

Hasta la fecha, muchas proteínas de mamífero se producen en células hospedadoras, por ejemplo, transfectando células con ADN que codifica dichas proteínas y haciendo crecer las células recombinantes en condiciones favorables para la expresión de dichas proteínas. Las proteínas secretadas por las células al medio de cultivo celular, o que se encuentran dentro de las células, pueden separarse del medio de cultivo y otros componentes usando técnicas cromatográficas, por ejemplo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, y similares. Para aplicaciones farmacéuticas adicionales, la pureza es de particular importancia. Sin embargo, al mismo tiempo debe conservarse la actividad biológica de la proteína después de una purificación completa de las proteínas de interés.

El concepto de elución de proteínas de unión a calcio de resinas de intercambio aniónico mediante cationes divalentes se notificó por primera vez hace casi treinta años. Aunque se aisló satisfactoriamente factor VII bovino de plasma bovino, la purificación de factor VII humano era todavía problemática, es decir el material producido era sólo parcialmente puro o se obtenía en cantidades tan pequeñas que se caracterizó como actividad sin proteína detectable. Los profesionales en el campo tuvieron éxito en el aislamiento de factor VII humano de plasma humano en cantidades suficientes (con un rendimiento de aproximadamente el 30 %) por medio de la adsorción de proteínas a un catión divalente, es decir citrato de bario, y luego separando la proteína mediante cromatografía de intercambio aniónico. Además, estaban disponibles procedimientos para recuperar y purificar proteínas dependientes de vitamina K del medio de un cultivo celular que produce proteínas dependientes de vitamina K con diferentes actividades específicas por medio de resinas de intercambio iónico convencionales, por ejemplo resinas de intercambio aniónico, y usando un eluyente que contiene cationes divalentes, por ejemplo ión de calcio (Ca^{2+}), ión de bario (Ba^{2+}) e ión de estroncio (Sr^{2+}).

Además, estaban disponibles procedimientos para la purificación de factor IX (FIX) en una disolución, que comprendían las etapas de aplicar la disolución que contiene FIX a una resina de intercambio aniónico, lavar la resina de intercambio aniónico con una disolución que tiene una conductividad que es menor que la requerida para eluir FIX de la resina, y eluir FIX de la resina de intercambio aniónico con un primer eluyente que incluye cationes divalentes para formar un primer eluato. El primer eluato se aplica entonces a una resina de heparina o similar a heparina para formar un segundo eluato, y el segundo eluato se aplica a hidroxapatita para formar un tercer eluato, utilizando un agente de lavado de alta conductividad en la etapa de lavar.

El factor IX (FIX) es una serina proteasa dependiente de vitamina K del sistema de coagulación, que pertenece a la familia de peptidasas S1. FIX es inactivo a menos que se active mediante el factor XIa o factor VIIa. Para su activación, se requieren calcio y fosfolípidos de membrana. La deficiencia de FIX provoca el trastorno de hemorragia recesivo hereditario hemofilia B, que puede tratarse satisfactoriamente mediante la administración de FIX modificado postraduccionalmente, es decir fosforilado y sulfatado.

Además, el factor VII (FVII) es una serina proteasa dependiente de vitamina K que desempeña un papel significativo en la cascada de coagulación, donde inicia el proceso de coagulación con factor tisular (TF). Tras la lesión en un vaso, se expone TF a la sangre y FVII circulante. Una vez unido a TF, FVII se activa a FVIIa mediante trombina, factor Xa, IXa, XIIa, y el complejo FVIIa-TF cuyos sustratos son FX y FIX. Además, anexina V es una proteína celular del grupo de anexinas, que tiene la capacidad de unirse de una manera dependiente de calcio a fosfatidilserina y formar un retículo cristalino bidimensional unido a la membrana. Puede desempeñar un papel en la coagulación sanguínea, apoptosis, fagocitosis y formación de micropartículas derivadas de la membrana plasmática.

Por tanto, el problema que subyace a la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado para la purificación de proteínas de unión a cationes divalentes con alto rendimiento y alta pureza. La solución al problema técnico anterior se logra mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

60 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación de una proteína de unión a cationes divalentes que comprende las etapas de:

(a) cargar un primer material de resina de intercambio aniónico con la proteína de unión a cationes divalentes en un tampón de carga en ausencia de cationes divalentes o a una baja concentración de los mismos, en el que la baja

concentración se refiere a una concentración de 1000 μM como máximo; y opcionalmente lavar el material de resina de intercambio aniónico cargado con un tampón de lavado en ausencia de cationes divalentes;

5 (b) eluir la proteína de unión a cationes divalentes con un eluyente que comprende un contraanión para formar un eluato que contiene la proteína de unión a cationes divalentes;

(c) complementar el eluato obtenido en la etapa (b) con al menos un catión divalente y aumentar el pH;

10 (d) cargar un segundo material de resina de intercambio aniónico con el eluato complementado obtenido en la etapa (c); y

(e) recoger el flujo no retenido que contiene la proteína de unión a cationes divalentes.

15 2. El procedimiento según el punto 1, en el que en la etapa (c) el pH del eluato complementado se aumenta en al menos 0,5 unidades de pH.

20 3. El procedimiento según el punto 1 ó 2, en el que el eluyente en la etapa (b) tiene una conductividad que es mayor que la conductividad del tampón de carga en la etapa (a) y el tampón de lavado en la etapa (a), en el caso de que se lleve a cabo una etapa de lavado, y en el que el eluato complementado en la etapa (c) tiene una conductividad que es menor que la conductividad del eluyente en la etapa (b).

25 4. El procedimiento según cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que el al menos un catión divalente en la etapa (c) se selecciona del grupo que consiste en Ca^{2+} , Be^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y Cu^{2+} , o combinaciones de los mismos.

30 5. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en el que los materiales de resina de intercambio aniónico primero y segundo tienen cada uno un grupo cargado positivamente que se selecciona independientemente del grupo que consiste en dietilaminoetano (DEAE), dimetilaminoetano (DMAE), trimetilaminoetilo (TMAE), polietilimimina (PEI), aminoalquilo cuaternario, aminoetano cuaternario (QAE) y amonio cuaternario (Q).

35 6. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en el que los materiales de resina de intercambio aniónico primero y segundo portan cada uno una amina primaria como ligando que se selecciona independientemente del grupo que consiste en aminohexilo, benzamidina, lisina y arginina.

7. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en el que la proteína de unión a cationes divalentes es una proteína de unión a calcio.

40 8. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1 a 7, en el que la proteína de unión a cationes divalentes es una proteína dependiente de vitamina K.

45 9. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1 a 8, en el que la proteína de unión a cationes divalentes se selecciona del grupo que consiste en factor II, factor VII, factor IX, factor X, proteína C, proteína S, anexina y calmodulina, con particular preferencia del grupo que consiste en factor IX, factor VII y anexina V. La proteína de unión a cationes divalentes puede o bien derivarse de una fuente natural, por ejemplo plasma, o bien puede producirse de manera recombinante.

50 10. El procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en el que el pH del tampón de carga en la etapa de cargar (a) y/o el pH del tampón de lavado en la etapa de lavar opcional (a) es \leq pH 7,4, preferiblemente de entre pH 5,5 y pH 7,0, con incluso más preferencia de entre pH 6,0 y pH 7,0, con incluso más preferencia de entre pH 6,5 y pH 7,0.

Descripción detallada de la invención

55 En un aspecto, la presente invención se refiere un procedimiento para la purificación de una proteína de unión a cationes divalentes que comprende las etapas de:

60 (a) cargar un primer material de resina de intercambio aniónico con la proteína de unión a cationes divalentes en un tampón de carga en ausencia de cationes divalentes o a una baja concentración de los mismos, en el que la baja concentración se refiere a una concentración de 1000 μM como máximo; y opcionalmente lavar el material de resina de intercambio aniónico cargado con un tampón de lavado en ausencia de cationes divalentes;

(b) eluir la proteína de unión a cationes divalentes con un eluyente que comprende un contraanión para formar un eluato que contiene la proteína de unión a cationes divalentes;

65 (c) complementar el eluato obtenido en la etapa (b) con al menos un catión divalente y aumentar el pH;

(d) cargar un segundo material de resina de intercambio aniónico con el eluato complementado obtenido en la etapa (c); y

(e) recoger el flujo no retenido que contiene la proteína de unión a cationes divalentes.

El término “en ausencia de cationes divalentes” tal como se usa en el presente documento se refiere a la ausencia de cationes divalentes libres en el tampón, en el que pueden estar presentes cationes divalentes que están unidos a una proteína o complejados con o mediante un quelante, por ejemplo EDTA. “A una baja concentración de los mismos” en este contexto se refiere a una concentración de cationes divalentes en el intervalo μM , en particular una concentración de $1000 \mu\text{M}$ como máximo, preferiblemente $800 \mu\text{M}$ como máximo, con incluso más preferencia $500 \mu\text{M}$ como máximo. Para esta solicitud, el término “en ausencia de cationes divalentes” pretende abarcar también la definición anterior para “a una baja concentración de los mismos”.

La carga del primer material de resina de intercambio aniónico con la proteína de unión a cationes divalentes en un tampón de carga en ausencia de cationes divalentes puede llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. En particular, un experto en la técnica conoce bien las condiciones adecuadas para cargar la proteína de unión a cationes divalentes en el material de resina de intercambio aniónico. Las condiciones específicas para la conductividad del tampón de carga que permite la unión del producto dependen de las propiedades particulares de la proteína y el material de resina de intercambio aniónico usado (por ejemplo densidad de ligando, presentación de ligando, etc.). Los cationes divalentes se unen a proteínas en regiones que son habitualmente altamente ácidas (es decir, cargadas negativamente). Las cargas negativas se enmascaran cuando se une el catión divalente. Sin embargo, al cargar el material de intercambio aniónico con la proteína de unión a cationes divalentes en ausencia de cationes divalentes, por ejemplo retirando el catión divalente unido mediante un quelante, por ejemplo EDTA, la proteína porta parches sumamente cargados negativamente en la superficie que permiten una unión fuerte a un ligando de intercambio aniónico. Las condiciones para cargar una proteína sobre un material de resina de intercambio aniónico requieren siempre además un equilibrio entre el pH y la concentración de los contraiones, por ejemplo Cl^- . La química del contraión también influye en el comportamiento de elución, por ejemplo Cl^- porta una carga negativa, y el fosfato a pH neutro porta dos cargas negativas. Este último puede tener un poder de elución superior en comparación con Cl^- , incluso cuando la conductividad es menor.

Las concentraciones de sal de las disoluciones y tampones usados en la presente invención están normalmente en el intervalo entre 20 y 200 mM (NaCl), preferiblemente entre 100 y 150 mM (NaCl) para el tampón de lavado. Las concentraciones de sal preferidas para el tampón de elución son 300-400 mM (NaCl), mientras que los tampones de equilibrado de la columna tendrán preferiblemente la misma conductividad y/o concentración de NaCl que la carga.

Además, se conocen bien en la técnica tampones de carga adecuados para cargar una proteína de unión a cationes divalentes en un material de intercambio aniónico en la etapa (a) del procedimiento de la presente invención, que proporcionan condiciones en las que la proteína de unión a cationes divalentes se une al material de intercambio aniónico. Por ejemplo, el tampón de carga puede tener un pH de $\leq \text{pH } 7,4$, preferiblemente $\leq \text{pH } 7,0$, más preferiblemente $\leq \text{pH } 6,5$ y lo más preferiblemente $\leq \text{pH } 6,0$. Preferiblemente, el pH del tampón de carga no es inferior a 5,5, preferiblemente de entre pH 5,5 y pH 7,0, con incluso más preferencia de entre pH 6,0 y pH 7,0, con incluso más preferencia de entre pH 6,5 y pH 7,0.

La carga puede ser, por ejemplo, un sobrenadante de cultivo celular que comprende la proteína de unión a cationes divalentes y que está esencialmente tamponada con carbonato, con o sin un tampón de carga adicional.

El tampón de carga para la segunda etapa de intercambio aniónico puede ser el mismo que anteriormente para la primera etapa de intercambio aniónico. La diferencia entre las dos etapas de intercambio aniónico tal como se proporcionan según la presente invención es esencialmente la siguiente:

a) La primera columna de intercambio aniónico se carga con el material de partida, es decir en una realización preferida con el material de cultivo celular. Este es un material de partida altamente impuro. La segunda columna de intercambio aniónico se carga con material que ya se ha purificado en algún grado, como es el caso del material obtenido tras la etapa de elución (y complementación).

b) La primera etapa de intercambio aniónico se lleva a cabo en ausencia de cationes divalentes, mientras que cuando se lleva a cabo la segunda etapa de intercambio aniónico, el material de carga se ha complementado con cationes divalentes.

c) La conductividad de la carga en el segundo intercambio aniónico se selecciona en una realización preferida para que sea menor que la conductividad de la etapa de elución en la primera columna de intercambio aniónico.

d) En consecuencia, la primera etapa de intercambio aniónico se lleva a cabo en un modo de unión a producto mientras que la segunda etapa de intercambio aniónico se lleva a cabo en un modo de no unión a producto.

5 Puede contener cualquier concentración de sal adecuada para unir la proteína de unión a cationes divalentes al material de resina de intercambio aniónico, lo que puede determinar fácilmente un experto en la técnica. En una realización preferida, el tampón de carga puede contener un agente quelante, por ejemplo EDTA, preferiblemente EDTA 2 mM. Un tampón de carga que contiene la proteína de unión a cationes divalentes que puede aplicarse al material de resina de intercambio aniónico en el procedimiento de la presente invención puede contener, por ejemplo, MES 20 mM y EDTA 2 mM.

10 El procedimiento de la presente invención comprende opcionalmente la etapa de lavar el material de resina de intercambio aniónico cargado con un tampón de lavado en ausencia de cationes divalentes. Esta etapa de lavar puede llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Se conocen bien en la técnica tampones de lavado adecuados para eliminar por lavado impurezas del material de intercambio aniónico esencialmente sin eluir la proteína de unión a cationes divalentes. Por ejemplo, el tampón de lavado puede tener un $\text{pH} \leq \text{pH } 7,4$, preferiblemente $\leq \text{pH } 7,0$, más preferiblemente $\leq \text{pH } 6,5$ y lo más preferiblemente $\leq \text{pH } 6,0$. Preferiblemente, el pH no es inferior a 5,5, preferiblemente de entre pH 5,5 y pH 7,0, con incluso más preferencia de entre pH 6,0 y pH 7,0, con incluso más preferencia de entre pH 6,5 y pH 7,0.

20 Puede contener cualquier concentración de sal adecuada para lavar el material de resina de intercambio aniónico sin eluir la proteína de unión a cationes divalentes en una cantidad significativa que puede determinar fácilmente un experto en la técnica. Por ejemplo, el tampón de lavado puede contener un agente de tampón adecuado como por ejemplo Tris o MES, preferiblemente MES 20 mM. Adicionalmente, puede contener un agente quelante como por ejemplo EDTA, preferiblemente EDTA 2 mM. Además, puede contener una sal adecuada para regular la conductividad del tampón de lavado, como por ejemplo NaCl, que puede estar presente en una concentración de ≤ 200 mM, preferiblemente desde 100 mM hasta 200 mM, más preferiblemente desde 150 mM hasta 200 mM, más preferiblemente desde 170 mM hasta 190 mM y lo más preferiblemente desde 175 mM hasta 185 mM. En otra realización preferida de la present solicitud, el tampón de lavado contiene NaCl de 100 a 200 mM. El valor absoluto para la concentración de sal depende de la proteína de unión a cationes divalentes que va a purificarse, en donde está dentro del conocimiento del experto en la técnica determinar qué proteínas de unión a cationes divalentes requieren concentraciones de sal inferiores o superiores para conseguir la pureza óptima.

30 La elución de la proteína de unión a cationes divalentes con un eluyente que comprende un contraión puede llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. En particular, se conocen bien en la técnica eluyentes adecuados que contienen contraiones adecuados. Los contraiones preferidos incluyen Cl^- , bromuro, borato, ácidos sulfónicos y acetato, en los que se prefiere particularmente Cl^- . En una realización preferida, el pH del eluyente es el mismo que el pH del tampón de carga en la etapa (a). Por ejemplo, el eluyente puede tener un $\text{pH} \leq \text{pH } 7,4$, preferiblemente $\leq \text{pH } 7,0$, más preferiblemente $\leq \text{pH } 6,5$ y lo más preferiblemente $\leq \text{pH } 6,0$, preferiblemente no inferior a pH 5,5, preferiblemente de entre pH 5,5 y pH 7,0, con incluso más preferencia de entre pH 6,0 y pH 7,0, con incluso más preferencia de entre pH 6,5 y pH 7,0.

40 Puede contener cualquier concentración de sal adecuada para eluir la proteína de unión a cationes divalentes del primer material de resina de intercambio aniónico sin eluir impurezas en una cantidad significativa que puede determinar fácilmente un experto en la técnica. Por ejemplo, puede contener un agente de tampón adecuado como por ejemplo MES, preferiblemente MES 20 mM, Tris, HEPES, Tris/acetato, histidina, Gly-Gly, MOPS o tricina, a concentraciones que oscilan normalmente entre 5 y 50 mM. La siguiente es una lista de tampones particularmente preferidos:

45 Tris: (tampona a $\text{pH} = 8,06 \pm 1,0$)

MES: (tampona a $\text{pH} = 6,2 \pm 1,0$)

50 HEPES: (tampona a $\text{pH } 7,7 \pm 1,0$)

MOPS: (tampona a $\text{pH} = 7,3 \pm 1,0$)

55 Tricina: (tampona a $\text{pH} = 8,3 \pm 1,0$)

Histidina: (tampona a $\text{pH} = 7,6 \pm 1,0$)

Gly-Gly: (tampona a $\text{pH} = 7,4 \pm 1,0$)

60 Bis-Tris: (tampona a $\text{pH} = 6,35 \pm 1,0$)

ACES: (tampona a $\text{pH} = 7,0 \pm 1,0$) (ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico)

65 ADA: (tampona a $\text{pH} = 7,0 \pm 1,0$) (ácido N-(2-acetamido)iminodiacético)

También puede contener una sal adecuada para regular la conductividad del tampón de lavado, como por ejemplo NaCl, que puede estar presente en una concentración de 100-200 mM. El valor absoluto para la concentración de sal depende de la proteína de unión a cationes divalentes que va a purificarse, en donde está dentro del conocimiento del experto en la técnica determinar qué proteínas de unión a cationes divalentes requieren concentraciones de sal inferiores o superiores para conseguir la pureza óptima. Un eluyente que puede aplicarse en el procedimiento de la presente invención puede contener por ejemplo MES 20 mM y NaCl 350 mM y puede tener un pH de 6,0.

Según el procedimiento de la presente invención, el eluato obtenido en la etapa (b) se complementa con al menos un catión divalente en la etapa (c). En una realización preferida, el eluato se complementa con un catión divalente, seleccionado del grupo que consiste en Ca^{2+} , Be^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y Cu^{2+} , o combinaciones de los mismos. El catión está presente preferiblemente en el eluato complementado a una concentración desde 1 mM hasta 20 mM, más preferiblemente en una concentración desde 1 mM hasta 10 mM, lo más preferiblemente en una concentración de 2 mM. El catión está presente en el eluato en forma de una sal adecuada con un anión. Un experto en la técnica conoce aniones adecuados y comprenden por ejemplo aniones basados en sulfato, fosfato, carbonato y borato, o combinaciones de los mismos. La sal que comprende el catión divalente puede estar presente en el eluato en una concentración desde 1 mM hasta 20 mM, preferiblemente 2 mM. En una realización preferida, la sal es CaCl_2 . En una realización particularmente preferida, el eluato contiene CaCl_2 2 mM.

Según el procedimiento de la presente invención, el pH en el eluato complementado obtenido en la etapa (b) se aumenta en la etapa (c). En realizaciones preferidas, el pH del eluato complementado se aumenta en al menos 0,5 unidades de pH, preferiblemente al menos 1,0 unidades de pH, más preferiblemente al menos 1,5 unidades de pH, lo más preferiblemente al menos 2,0 unidades de pH. Preferiblemente, el eluato complementado tiene un pH de más de 6,5, preferiblemente de más de 7,0, con incluso más preferencia un $\text{pH} \geq 7,4$, y más preferiblemente $\geq 8,0$, pero no más de pH 9,0, siempre que el pH del eluato complementado en la etapa (c) sea mayor que el pH del eluyente en la etapa (b).

En realizaciones preferidas del procedimiento de la presente invención, el eluyente en la etapa (b) tiene una conductividad que es mayor que la conductividad del tampón de carga en la etapa (a) y, en el caso de que se lleve a cabo una etapa de lavado, el tampón de lavado en la etapa (a), y el eluato complementado en la etapa (c) tienen una conductividad que es menor que la conductividad del eluyente en la etapa (b). En particular, el tampón de carga en la etapa (a) y, en el caso de que se lleve a cabo una etapa de lavado, el tampón de lavado en la etapa (a) pueden tener una conductividad de 8-18 mS/cm (temperatura ambiente). Además, el tampón de elución en la etapa (b) puede tener una conductividad de 25-35 mS/cm (temperatura ambiente). Finalmente, el eluato complementado en la etapa (c) puede tener una conductividad de $c: < 18$ mS/cm (temperatura ambiente).

Tal como se usa en la presente, el término "material de resina de intercambio aniónico" no fundamenta una restricción específica. Según la presente invención, la primera y segunda resina incluyen cualquier material adecuado para cromatografía de intercambio aniónico conocido en la técnica, como por ejemplo un material de cromatografía basado en agarosa, por ejemplo Sepharose como Fast Flow o Capto, material sintético polimérico, por ejemplo polimetacrilato como Toyopearl, poliestireno/divinilbenceno, por ejemplo Poros, Source, o celulosa. En un ejemplo específico de la presente invención, el material de resina de intercambio aniónico primero y segundo es Sepharose, que se basa en agarosa modificada, cuyas cadenas de polisacárido se reticular para formar una red tridimensional. En una realización preferida, los materiales de resina de intercambio aniónico primero y segundo incluyen, pero no se limitan a, resinas que portan una amina primaria como ligando, por ejemplo aminohexil-Sepharose, benzamidina-Sepharose, lisina-Sepharose o arginina-Sepharose. En otra realización preferida, los materiales de resina de intercambio aniónico primero y segundo incluyen, pero no se limitan a, resinas que tienen un resto cargado positivamente a pH neutro, tal como alquilaminoetano, como dietilaminoetano (DEAE), dimetilaminoetano (DMAE) o trimetilaminoetilo (TMAE), polietilenimina (PEI), aminoalquilo cuaternario, aminoetano cuaternario (QAE), amonio cuaternario (Q), y similares. En una realización particularmente preferida, el material de resina de intercambio aniónico es Q-Sepharose Fast Flow (Q-Sepharose FF). Según el procedimiento de la presente invención, los materiales de resina de intercambio aniónico primero y segundo pueden ser iguales o pueden ser diferentes.

La proteína de unión a cationes divalentes según la presente invención puede ser cualquier proteína de unión a cationes divalentes, como por ejemplo una proteína de unión a calcio y/o una proteína dependiente de vitamina K. En una realización preferida, la proteína de unión a cationes divalentes se selecciona del grupo que consiste en factor II, factor VII, factor IX, factor X, proteína C, proteína S, anexina y calmodulina, con particularmente preferencia del grupo que consiste en factor IX (FIX), factor VII (FVII) y anexina V.

La proteína de unión a cationes divalentes puede obtenerse usando procedimientos conocidos por un experto en la técnica como, por ejemplo proteínas derivadas de plasma, proteínas producidas de manera transgénica o proteínas producidas de manera recombinante, por ejemplo usando células CHO. Un experto en la técnica conoce bien procedimientos secretores y no secretores para extraer proteínas de un cultivo celular. Esto puede incluir cualquier procedimiento conocido en la técnica para (i) la producción de ADN recombinante mediante ingeniería genética, por ejemplo por medio de transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN, (ii) la introducción de ADN

recombinante en células procariotas o eucariotas mediante transfección, por ejemplo por medio de electroporación o microinyección, (iii) el cultivo de dichas células transformadas, por ejemplo de una manera continua o discontinua, (iv) la expresión de una proteína de unión a cationes divalentes, por ejemplo constitutiva o tras inducción, y (v) el aislamiento de la proteína, por ejemplo del medio de cultivo o mediante recolección de las células transformadas, con el fin de obtener una proteína de unión a cationes divalentes en bruto. Adicionalmente, el ADN recombinante que codifica para una proteína de unión a cationes divalentes, por ejemplo un plásmido, puede contener también una secuencia de ADN que codifica un marcador seleccionable para seleccionar las células que se han transfectado satisfactoriamente con el ADN recombinante.

Las proteínas pueden purificarse previamente para reducir las impurezas, por ejemplo mediante electroforesis en gel, cromatografía, filtración en gel, centrifugación, filtración, precipitación, cristalización o cualquier otro procedimiento conocido en la técnica. El término "impureza" tal como se usa en la presente incluye cualquier impureza que se origine a partir de la producción de la proteína de unión a cationes divalentes y puede incluir por ejemplo impurezas de proteínas de la célula hospedadora (HCP), impurezas de ácido nucleico, impurezas de polipéptido, impurezas de tampón y sal, impurezas que se originan a partir del medio de cultivo celular, impurezas relacionadas con productos, tales como dímeros o fragmentos, y combinaciones de las mismas.

En una realización preferida, la proteína de unión a cationes divalentes que se ha purificado según el procedimiento de la presente invención tiene una pureza con respecto a impurezas de proteína de la célula hospedadora de al menos el 95 % p/p, más preferiblemente al menos el 98 % p/p, más preferiblemente al menos el 99 % p/p y lo más preferiblemente al menos el 99,5 % p/p de proteína de unión a cationes divalentes en proteína total. Por consiguiente, en una realización preferida, el contenido de impurezas en la proteína de unión a cationes divalentes purificada es menor del 5 % p/p, más preferiblemente menor del 2 % p/p, más preferiblemente menor del 1 % p/p y lo más preferiblemente menor del 0,5 % p/p. Los valores en porcentaje de las impurezas se refieren a p/p de producto, es decir la proteína de unión a cationes divalentes purificada, y pueden medirse, por ejemplo, mediante HPLC o ELISA.

Además, se divulga en el presente documento una proteína de unión a cationes divalentes purificada que puede obtenerse mediante el procedimiento de la presente invención, así como un kit que comprende medios para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. En particular, el kit de la presente invención puede contener un tampón de carga y/o un eluyente y/o un tampón de lavado y/o una disolución de cationes divalentes que son adecuados para la purificación de una proteína de unión a cationes divalentes usando un material de resina de intercambio aniónico según la presente invención. En una realización preferida, el tampón de carga, el tampón de lavado y/o el eluyente son tal como se definieron anteriormente. Además, el kit de la presente invención puede contener un material de resina de intercambio aniónico adecuado.

La presente invención se refiere además al uso del procedimiento de la presente invención tal como se definió anteriormente para la purificación de una proteína de unión a cationes divalentes.

La presente invención proporciona un procedimiento eficaz para la purificación de una proteína de unión a cationes divalentes usando materiales de resina de intercambio aniónico que permiten una alta reducción de impurezas de la proteína relacionadas con el proceso con altos rendimientos de producto de manera simultánea.

En particular, el procedimiento de la presente invención se basa en los siguientes principios. Generalmente, la unión de proteínas a materiales de resina de intercambio aniónico aumenta a conductividades inferiores y valores de pH superiores. A la inversa, la unión de proteínas a materiales de resina de intercambio aniónico disminuye a conductividades superiores y valores de pH inferiores. En el procedimiento de la presente invención, la proteína de unión a cationes divalentes se carga y/o se lava preferiblemente a un pH bajo que todavía permite la unión de la proteína de unión a cationes divalentes al primer material de intercambio aniónico y no daña la integridad estructural o la actividad de la proteína de unión a cationes divalentes. En tales condiciones, muchas impurezas de proteína, en particular las que tienen un punto isoeléctrico (pI) mayor que las proteínas de unión a cationes divalentes, no se unen al primer material de resina de intercambio aniónico y, por tanto, se reduce en gran medida la unión de impurezas al primer material de resina de intercambio aniónico. Las impurezas de proteína que se unen al primer material de resina de intercambio aniónico en estas condiciones, es decir impurezas de proteína que tienen un bajo pI, pueden eluirse conjuntamente con la proteína de unión a cationes divalentes durante la elución. Sin embargo, el aumento del pH en el eluato complementado provoca que todas las proteínas se unan incluso más fuertemente al segundo material de resina de intercambio aniónico. Según el procedimiento de la presente invención, sólo la proteína de unión a cationes divalentes no se une al segundo material de intercambio aniónico debido a los cationes divalentes presentes en el eluato complementado. En este contexto, debe indicarse que el aumento del pH antes de la carga de un material de resina de intercambio aniónico es muy atípico para una cromatografía negativa, es decir una cromatografía en la que la proteína que va a purificarse se espera en el flujo no retenido, puesto que, tal como se ha establecido anteriormente, las proteínas se unen generalmente más fuertemente a materiales de resina de intercambio aniónico a valores de pH superiores. Al complementar el eluato del primer material de resina de intercambio aniónico con al menos un catión divalente, el procedimiento de la presente invención logra de manera sorprendente y ventajosa puridades superiores del producto de proteína de unión a cationes divalentes mediante cromatografía de intercambio aniónico.

En particular, la presente invención modifica ventajosamente la carga de superficie de las proteínas que van a purificarse aumentando el pH antes de la carga del segundo material de resina de intercambio aniónico. Un pH aumentado para la carga del segundo material de resina de intercambio aniónico fuerza a las impurezas a unirse al segundo material de resina de intercambio aniónico, mientras que la unión de la proteína que va a purificarse se inhibe mediante la complementación de cationes divalentes. Según la presente invención, las condiciones anteriores dan como resultado una alta pureza así como altos rendimientos de proteínas de unión a cationes divalentes. El procedimiento de la presente invención puede proporcionar una reducción significativa de impurezas de polipéptido relacionadas con el procedimiento por ejemplo cargando la disolución de proteína sobre un material de resina de intercambio aniónico a pH reducido, eluyendo el producto, complementado el eluato con al menos un catión divalente y aumentando el pH, antes de cargar el eluato complementado sobre un segundo material de resina de intercambio aniónico, y recoger el flujo no retenido.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan como guía para un experto en la técnica.

Ejemplo 1: Purificación de factor IX recombinante (rFIX)

Se produjo rFIX, una proteína dependiente de vitamina K, fermentando una línea celular CHO modificada genéticamente en un medio químicamente definido en modo de quimiostato. Se clarificó el sobrenadante de cultivo celular que contenía el producto mediante filtración en profundidad y filtración a través de un filtro de 0,2 µm. Entonces se complementó la recolección clarificada con EDTA 2 mM y se ajustó el pH a 6,0 con un tampón que contenía MES. El rFIX contenido en esta recolección clarificada y acondicionada se purificó entonces por medio de un procedimiento de purificación cromatográfica de dos etapas en Q-Sepharose Fast Flow.

Primera purificación en Q-Sepharose Fast Flow (modo de intercambio iónico, pH= 6,0)

Se equilibró la resina en primer lugar con tampón de equilibrado (MES 20 mM, EDTA 2 mM, pH= 6,0) y luego se aplicó la carga que contenía el rFIX acondicionado a la resina. Tras un lavado con tampón de lavado (MES 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 180 mM, pH= 6,0), se eluyó el producto con tampón de elución (MES 20 mM, NaCl 350 mM, pH= 6,0). En la tabla 1 se muestra un resumen de los rendimientos de producto y las tasas de eliminación de impurezas con un rendimiento típico de una etapa de captura de intercambio iónico.

Tabla 1: Primera purificación por intercambio iónico en Q-Sepharose Fast Flow (modo de intercambio iónico): Rendimiento y pureza

Etapa	Rendimiento de rFIX		Actividad de rFIX		Actividad espec.	CHO HCP	
	mg	% de rendimiento	Unidades	% de rendimiento	Unidades/mg	mg	reducción
Carga	6,8	-	444	-	65	7,5	-
Lavado	1,2	17	0,4	0,1	<1	0,51	-
Elución	5,5	80	504	114	92	0,8	9,4

Segunda purificación en Q-Sepharose Fast Flow (modo de filtración de calcio, pH= 7,6)

Se complementó el conjunto de eluatos obtenidos a partir de la primera etapa de purificación en Q-Sepharose Fast Flow con aproximadamente Ca²⁺ 8 mM, diluido con un tampón Tris hasta una conductividad de aproximadamente 12 mS/cm (a temperatura ambiente) y se fijó el pH a 7,6. Se equilibró la resina en primer lugar con tampón de equilibrado (Tris 20 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 90 mM, pH= 7,8) y se bombeó la disolución que contenía producto acondicionado sobre la columna. Se fijaron las condiciones cromatográficas de un modo que el producto no pudiera unirse, mientras que la mayoría de las impurezas de proteína de la célula hospedadora CHO y especies de producto inactivas sí se unen a la resina de intercambio aniónico. El producto altamente activo y purificado está contenido en la fracción de flujo no retenido en la columna de la segunda etapa de intercambio aniónico en Q-Sepharose Fast Flow. Las impurezas unidas se separan de la resina con NaCl 1 M. En la tabla 2 se representa un resumen de los rendimientos de producto y tasas de eliminación de impurezas.

Tabla 2: Segunda purificación por intercambio aniónico en Q-Sepharose Fast Flow (modo de filtración de Ca): Rendimiento y pureza

Etapa	Rendimiento de rFIX		Actividad de rFIX		Actividad espec.	CHO HCP	
	mg	% de rendimiento	Unidades	% de rendimiento	Unidades/mg	mg	reducción

Carga	3,9	-	183	-	47	0,44	-
Flujo no retenido	1,4	35	241	132	175	0,011	40
Elución	2,4	60	441	23	18	0,54	-

Los resultados muestran que el producto contenido en la fracción sin unión tiene una pureza de > 99% y una actividad específica de 175 unidades/mg. Estos datos indican que la segunda etapa de purificación por intercambio aniónico que funcionaba en modo de filtración de Ca (sin unión del producto) a pH= 7,6 tiene una capacidad de eliminación significativa para la eliminación de impurezas relacionadas con el proceso (CHO HCP) e impurezas relacionadas con el producto (especies de rFIX inactivas) con un factor de reducción de CHO de 40 y un aumento de la actividad específica de FIX de casi 4 veces.

La combinación de ambas etapas cromatográficas, la primera etapa de purificación por intercambio aniónico a pH= 6,0 (modo de intercambio iónico) y la segunda etapa de purificación por intercambio aniónico (modo de filtración de calcio, sin unión del producto, pH=7,6), da como resultado una tasa de eliminación de CHO HCP de 376 que habitualmente no puede obtenerse con cromatografía de intercambio iónico. La pureza de rFIX tras la segunda etapa de purificación por intercambio aniónico (modo sin unión) es > 99 %.

Ejemplo 2: Purificación de FVII con el procedimiento de intercambio iónico de 2 etapas en Poros Q

Se produjo rFVII, una proteína dependiente de vitamina K, fermentando una línea celular CHO modificada genéticamente en un medio químicamente definido en modo de quimiostato. Se clarificó el sobrenadante de cultivo celular que contenía el producto mediante filtración en profundidad y filtración a través de un filtro de 0,2 µm. Entonces se complementó la recolección clarificada con EDTA 10 mM y se ajustó el pH a 6,0 con un tampón que contenía MES. El FVII contenido en esta recolección clarificada y condicionada se purificó entonces por medio de un procedimiento de purificación cromatográfica de 2 etapas en Poros Q.

1) Primera purificación en Poros Q (modo de intercambio iónico, pH= 6,0)

Se activó la resina en primer lugar con 8 volúmenes de columna de NaCl 1 M para saturar los ligandos de resina con cloruro. Entonces se equilibró la resina con 8 volúmenes de columna de tampón de equilibrado (MES 20 mM, EDTA 2 mM, pH= 6,0) seguido por la carga de la recolección que contenía FVII acondicionado a una velocidad de flujo lineal de 60 cm/h. Tras terminarse la carga, se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de tampón de lavado 1 (MES 20 mM, EDTA 2 mM, pH= 6,0) y 10 volúmenes de columna de tampón de lavado (MES 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 180 mM, pH= 6,0). Se eluyó FVII unido con 8 VC de tampón de elución en modo de intercambio iónico (tampón: MES 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 350 mM, pH= 6,0) a una velocidad de flujo lineal de 30 cm/h. En la tabla 3 se muestra un resumen de los rendimientos de producto y tasas de eliminación de impurezas. Aproximadamente el 96 % de la proteína de célula hospedadora CHO se eliminó en esta etapa dando como resultado un factor de reducción de 23.

2) Segunda purificación en Poros Q (modo de filtración de calcio, pH= > 7,6, temperatura ambiente (TA)).

Se complementó el conjunto de eluatos obtenidos a partir de la primera etapa de purificación en Poros Q con aproximadamente Ca²⁺ 8 mM, diluido con un tampón Tris hasta una conductividad de aproximadamente 12 mS/cm (TA) y se fijó el pH a >7,6. (tampón de dilución 1: Tris 20 mM, CaCl₂ 10 mM, polisorbato 80 al 0,1 %, pH= 7,8 TA, tampón de dilución 2 (tampón de equilibrado): Tris 20 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 90 mM, polisorbato 80 al 0,1 %, pH= 7,8 TA).

Se equilibró la resina en primer lugar con 10 VC de tampón de equilibrado (Tris 20 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 90 mM, polisorbato 80 al 0,1 %, pH= 7,8 TA) y se bombeó la disolución de FVII complementada con calcio sobre la columna. Se fijaron las condiciones cromatográficas de un modo que el producto no se uniera, mientras que la mayoría de las impurezas de proteína de la célula hospedadora CHO y especies de producto inactivas sí se unían a la resina de intercambio aniónico Poros Q. El producto activo y purificado está contenido en la fracción de flujo no retenido en la columna de la segunda etapa de intercambio aniónico en Poros Q. Se separaron las impurezas unidas de la resina con NaCl 1 M. En la tabla 4 se representa un resumen de los rendimientos de producto y tasas de eliminación de impurezas. Los datos analíticos para la fracción de carga se tomaron del conjunto de eluatos de la tanda de intercambio iónico 1 (véase la tabla 3). Los resultados muestran que el producto contenido en la fracción sin unión tiene una pureza de > 95 % y una actividad específica de 3228 unidades de FVII/mg de FVII Ag. Estos datos indican que la segunda etapa de purificación por intercambio aniónico que funcionaba en modo de filtración de Ca (sin unión del producto) a >7,6 tenía un rendimiento significativo para la eliminación de impurezas relacionadas con el proceso (proteínas de células hospedadoras CHO) con un factor de reducción de CHO de >27. Aproximadamente el 99,9 % de la proteína de célula hospedadora CHO se eliminó mediante el procedimiento de purificación de 2 etapas dando como resultado un factor de reducción de CHO HCP total de >725.

Resumen:

La combinación de ambas etapas cromatográficas, es decir la primera etapa de purificación por intercambio aniónico a pH= 6,0 (modo de intercambio iónico) y la segunda etapa de purificación por intercambio aniónico (modo de filtración de calcio, sin unión del producto, pH= >7,6) en Poros Q, dio como resultado una tasa de eliminación de CHO HCP de > 725 que habitualmente sólo puede obtenerse con cromatografía de afinidad pero no con cromatografía de intercambio iónico. La pureza de rFVII tras la segunda etapa de purificación por intercambio aniónico (modo sin unión) era > 95 %. Los datos muestran que el procedimiento de purificación de 2 etapas también puede aplicarse y adaptarse para FVII (también una proteína dependiente de vitamina K) y puede realizarse en una resina Q alternativa.

10 Tabla 3: Primera purificación por intercambio iónico en Poros Q (modo de intercambio iónico): Equilibrio de rendimiento e impurezas

Etapa	FVII:Ag		FVII:C		CHO HCP	
	mg	% de rendimiento	Unidades	% de rendimiento	mg	reducción
Carga	5,93	-	17086	-	38,4	-
Elución	0,91	15	4414	26	1,68	23

15 El material de carga era sobrenadante de cultivo celular clarificado de una línea celular CHO que produce FVII complementado con EDTA 2 mM y con pH ajustado a 6,0. Se realizó el experimento de purificación con tampones MES a un pH= 6,0 y se indujo la elución mediante contraiones cloruro. FVII:C: Ensayo cromogénico de FVII.

20 Tabla 4: Segunda purificación por intercambio aniónico en Poros Q (modo de filtración de Ca): Equilibrio de rendimiento e impurezas

Etapa	FVII:Ag		FVII:C		CHO HCP	
	mg	% de rendimiento	Unidades	% de rendimiento	mg	reducción
Carga	0,91	-	4414	-	1,68	-
Flujo no retenido	1,04	>100	3358	76	<0,053	>27
Etapa 1+2		17		20		>725

25 El material de carga era el conjunto de eluatos de la primera etapa de purificación por intercambio aniónico complementado con calcio 8 mM y ajustado a pH=> 7,6. Se realizó el experimento de purificación con tampones Tris a un pH> 7,6 y el producto estaba contenido en la fracción sin unión. FVII:C: Ensayo cromogénico de FVII.

25 Ejemplo 3: Purificación de FVII con el procedimiento de intercambio iónico de 2 etapas en Q-Sepharose Fast Flow

30 Se produjo rFVII, una proteína dependiente de vitamina K, fermentando una línea celular CHO modificada genéticamente en un medio químicamente definido en modo de quimiostato. Se clarificó el sobrenadante de cultivo celular que contenía el producto mediante filtración en profundidad y filtración a través de un filtro de 0,2 µm. Entonces se complementó la recolección clarificada con EDTA 10 mM y se ajustó el pH a 6,0 con un tampón que contenía MES. El FVII contenido en esta recolección clarificada y acondicionada se purificó entonces por medio de un procedimiento de purificación cromatográfica de 2 etapas en Q-Sepharose Fast Flow.

35 1) Primera purificación en Q-Sepharose Fast Flow (modo de intercambio iónico, pH=6,0)

35 Se activó la resina en primer lugar con 8 volúmenes de columna de NaCl 1 M para saturar los ligandos de resina con cloruro. Entonces se equilibró la resina con 8 volúmenes de columna de tampón de equilibrado (MES 20 mM, EDTA 2 mM, pH= 6,0) seguido por la carga de la recolección que contenía FVII acondicionado a una velocidad de flujo lineal de 60 cm/h. Tras terminarse la carga, se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de tampón de lavado 1 (MES 20 mM, EDTA 2 mM, pH= 6,0) y 10 volúmenes de columna de tampón de lavado 2 (MES 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 180 mM, pH= 6,0). Se eluyó FVII unido con 8 VC de tampón de elución en modo de intercambio iónico (tampón: MES 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 350 mM, pH= 6,0) a una velocidad de flujo lineal de 30 cm/h. En la tabla 5 se muestra un resumen de los rendimientos de producto y tasas de eliminación de impurezas con rendimientos para antígeno de FVII y actividad en el intervalo del 63 – 67 %. Aproximadamente el 87 % de la proteína de la célula hospedadora se eliminó, dando como resultado un factor de reducción de 7,8.

40 2) Segunda purificación en Poros Q (modo de filtración de calcio, pH= > 7,6 TA)

50 Se complementó el conjunto de eluatos obtenidos a partir de la primera etapa de purificación en Q-Sepharose Fast Flow con aproximadamente Ca²⁺ 8 mM, diluido con un tampón Tris hasta una conductividad de aproximadamente 12 mS/cm (TA) y se fijó el pH a > 7,6. (Tampón de dilución 1: Tris 20 mM, CaCl₂ 10 mM, polisorbato 80 al 0,1 %, pH= 7,8 TA, tampón de dilución 2 (tampón de equilibrado): Tris 20 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 90 mM, polisorbato 80 al

0,1 %, pH= 7,8 TA).

Se equilibró la resina en primer lugar con 10 VC de tampón de equilibrado (Tris 20 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 90 mM, polisorbato 80 al 0,1 %, pH= 7,8 TA) y luego se bombeó la disolución de FVII complementada con calcio sobre la columna a una velocidad de flujo lineal de 60 cm/h. Se fijaron las condiciones cromatográficas de un modo que el producto no se uniera, mientras que la mayoría de las impurezas de proteína de la célula hospedadora CHO sí se unían a la resina de intercambio aniónico Q-Sepharose Fast Flow. El producto activo y purificado está contenido en la fracción de flujo no retenido en la columna de la segunda etapa de intercambio aniónico en Q-Sepharose Fast Flow. Se separaron las impurezas unidas de la resina con NaCl 1 M. En la tabla 6 se representa un resumen de los rendimientos de producto y tasas de eliminación de impurezas. Los datos analíticos para la fracción de carga se tomaron del conjunto de eluatos de la tanda de intercambio iónico 1 (véase la tabla 5).

Los resultados muestran que el producto contenido en la fracción sin unión tiene una pureza del 99 % y una actividad específica de 2040 unidades de FVII/mg de FVII Ag. Estos datos indican que la segunda etapa de purificación por intercambio aniónico que funcionaba en modo de filtración de Ca (sin unión del producto) a pH= >7,6 tenía un rendimiento significativo para la eliminación de impurezas relacionadas con el proceso (proteínas de célula hospedadora CHO) con un factor de reducción de CHO de 50. Aproximadamente el 99,7 % de la proteína de célula hospedadora CHO se eliminó mediante el procedimiento de purificación de 2 etapas, dando como resultado un factor de reducción de CHO HCP total de 395.

Resumen del ejemplo 3:

La combinación de ambas etapas cromatográficas, es decir la primera etapa de purificación por intercambio aniónico a pH= 6,0 (modo de intercambio iónico) y la segunda etapa de purificación por intercambio aniónico (modo de filtración de calcio, sin unión del producto, pH= >7,6) en Q-Sepharose Fast Flow, dio como resultado una tasa de eliminación de CHO HCP de 395 que habitualmente sólo puede obtenerse con cromatografía de afinidad pero no con cromatografía de intercambio iónico. La pureza de rFVII tras la segunda etapa de purificación por intercambio aniónico (modo sin unión) era del 99 %. Los datos muestran que el procedimiento de purificación de 2 etapas también puede aplicarse y adaptarse para FVII.

Etapa	FVII:Ag		FVII:C		CHO HCP	
	mg	% de rendimiento	Unidades	% de rendimiento	mg	reducción
Carga	6,56	-	18375	-	22,5	-
Elución	4,13	63	12224	67	2,87	7,8

Tabla 5: Primera purificación por intercambio aniónico en Q-Sepharose Fast Flow (modo de intercambio iónico): Equilibrio de rendimiento e impurezas

El material de carga era sobrenadante de cultivo celular clarificado de una línea celular CHO que produce FVII complementado con EDTA 2 mM y con pH ajustado a 6,0. Se realizó el experimento de purificación con tampones MES a un pH= 6,0 y se indujo la elución mediante contraiones cloruro. FVII:C: Ensayo cromogénico de FVII.

Tabla 6: Segunda purificación por intercambio aniónico en Q-Sepharose Fast Flow (modo de filtración de Ca): Equilibrio de rendimiento e impurezas

Etapa	FVII:Ag		FVII:C		CHO HCP	
	mg	% de rendimiento	Unidades	% de rendimiento	mg	reducción
Carga	4,13	-	12224	-	2,87	-
Flujo no retenido	4,75	>100	9686	79	0,057	50
Etapa 1+2	-	72	-	53	-	395

El material de carga era el conjunto de eluatos de la primera etapa de purificación por intercambio aniónico complementado con calcio 8 mM y ajustado a pH=>7,6. Se realizó el experimento de purificación con tampones Tris a un pH>7,6 y el producto estaba contenido en la fracción sin unión. FVII:C: Ensayo cromogénico de FVII.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la purificación de una proteína de unión a cationes divalentes que comprende las etapas de:
- 5 (a) cargar un primer material de resina de intercambio aniónico con la proteína de unión a cationes divalentes en un tampón de carga en ausencia de cationes divalentes o a una baja concentración de los mismos, en el que la baja concentración se refiere a una concentración de 1000 μM como máximo; y opcionalmente lavar el material de resina de intercambio aniónico cargado con un tampón de lavado en ausencia de cationes divalentes;
- 10 (b) eluir la proteína de unión a cationes divalentes con un eluyente que comprende un contraanión para formar un eluato que contiene la proteína de unión a cationes divalentes;
- 15 (c) complementar el eluato obtenido en la etapa (b) con al menos un catión divalente y aumentar el pH;
- (d) cargar un segundo material de resina de intercambio aniónico con el eluato complementado obtenido en la etapa (c); y
- 20 (e) recoger la fracción no retenida que contiene la proteína de unión a cationes divalentes.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en la etapa (c) el pH del eluato complementado se aumenta en al menos 0,5 unidades de pH.
- 25 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el eluyente en la etapa (b) tiene una conductividad que es mayor que la conductividad del tampón de carga en la etapa (a) y el tampón de lavado en la etapa (a), en el caso de que se lleve a cabo una etapa de lavado, y en el que el eluato complementado en la etapa (c) tiene una conductividad que es menor que la conductividad del eluyente en la etapa (b).
- 30 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el al menos un catión divalente en la etapa (c) se selecciona del grupo que consiste en Ca^{2+} , Be^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y Cu^{2+} , o combinaciones de los mismos.
- 35 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los materiales de resina de intercambio aniónico primero y segundo tienen cada uno un grupo cargado positivamente que se selecciona independientemente del grupo que consiste en dietilaminoetano (DEAE), dimetilaminoetano (DMAE), trimetilaminoetilo (TMAE), polietilimina (PEI), aminoalquilo cuaternario, aminoetano cuaternario (QAE) y amonio cuaternario (Q).
- 40 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los materiales de resina de intercambio aniónico primero y segundo portan cada uno una amina primaria como ligando que se selecciona independientemente del grupo que consiste en aminohexilo, benzamidina, lisina y arginina.
- 45 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la proteína de unión a cationes divalentes es una proteína de unión a calcio.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la proteína de unión a cationes divalentes es una proteína dependiente de vitamina K.
- 50 9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la proteína de unión a cationes divalentes se selecciona del grupo que consiste en factor II, factor VII, factor IX, factor X, proteína C, proteína S, anexina y calmodulina, con particular preferencia del grupo que consiste en factor IX, factor VII y anexina V.
- 55 10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el pH del tampón de carga en la etapa de cargar (a) y/o el pH del tampón de lavado en la etapa de lavar opcional (a) es \leq pH 7,4, preferiblemente de entre pH 5,5 y pH 7,0, con incluso más preferencia de entre pH 6,0 y pH 7,0, con incluso más preferencia de entre pH 6,5 y pH 7,0.