

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 156**

51 Int. Cl.:

| | |
|--------------------|-----------|
| B01D 15/00 | (2006.01) |
| C07K 1/16 | (2006.01) |
| C07K 14/505 | (2006.01) |
| C07K 1/18 | (2006.01) |
| C07K 1/20 | (2006.01) |
| C07K 1/22 | (2006.01) |
| C07K 14/34 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2010 PCT/US2010/061313**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011 WO11133191**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2010 E 10850408 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 2560738**

54 Título: **Método simple para eliminación simultánea de múltiples impurezas a partir de sobrenadantes de cultivo a niveles ultrabajos**

30 Prioridad:

23.04.2010 US 327238 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.02.2020

73 Titular/es:

**SERUM INSTITUTE OF INDIA PRIVATE LIMITED (50.0%)
212/2, Off Soli Poonawalla Road
Hadapsar, Pune 411 028, MAH, IN y
FINA BIOSOLUTIONS, LLC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LEES, ANDREW y
JOSHI, JAYANT**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 743 156 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

5 Método simple para eliminación simultánea de múltiples impurezas a partir de sobrenadantes de cultivo a niveles ultrabajos

Antecedentes

10 Campo de la invención

Esta invención se dirige a un método para eliminar de manera simultánea, preferiblemente en una etapa múltiples impurezas a partir de muestra cruda que contiene productos que se producen mediante cultivo celular o fermentación y, en particular, el retiro de contaminantes tales como componentes del medio, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, y lipopolisacáridos a niveles ultrabajos. El producto puede producirse mediante células de levaduras, de bacterias o de mamíferos con impurezas que se reducen a nivel ultrabajo del 91% al 99,9% en comparación con la sustancia diana purificada. La invención se dirige también a los productos que se han purificado de acuerdo con este método.

Descripción de los antecedentes

20 Los polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos se sintetizan por diversos organismos tales como células de levaduras, de bacterias y de mamíferos, que pueden producirse mediante fermentación para fines comerciales en las aplicaciones de uso humano, veterinario o diagnóstico. La producción industrial de productos biotecnológicos a partir de estos organismos se realiza en primer lugar mediante fermentación en las aplicaciones de productos de uso humano, veterinario o diagnóstico. De manera adicional, los productos biosintéticos que se producen durante fermentación, nutrientes y componentes del medio contribuyen también a contaminantes. Resulta necesaria, de manera general, la producción de productos extremadamente puros con niveles ultrabajos de impurezas como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y lipopolisacáridos a partir de materiales de partida crudos tales como fluidos de fermentación. De manera adicional a los productos biosintéticos que se producen durante fermentación, nutrientes del medio aportan también contaminantes. La purificación de producto incluye normalmente etapas múltiples y complejas para reducir niveles de impureza a niveles aceptables. Los procesos convencionales para retirar impurezas incluyen extracción, cromatografía, precipitación, ultrafiltración, y muchos otros. Las etapas múltiples y complejas afectan de manera adversa el rendimiento, calidad, estabilidad, tiempo de procesamiento y operaciones de proceso. Además, estos procesos resultan costosos para llevar a cabo, requieren un alto grado de técnica para realizarlos, y una cantidad significativa de tiempo para reducir niveles de impureza.

35 La solicitud de patente de Estados Unidos nro. 5,747,663 se refiere a un proceso para reducción o retiro de endotoxina a partir de composiciones terapéuticas que derivan de manera biotecnológica. El proceso ha incorporado incubación con detergente no iónico antes de purificación cromatográfica. El medio cromatográfico que se reivindica es material de intercambio aniónico. La purificación cromatográfica incluye el uso de sal cloruro de sodio para lavado.

40 La solicitud de patente de Estados Unidos nro. 6,428,703 se refiere a un proceso para reducción o retiro de endotoxina a partir de macromoléculas biológicas. El proceso ha incorporado tratamiento con detergente no iónico sin período de incubación anterior a la purificación cromatográfica. El medio cromatográfico es material de intercambio aniónico. El otro elemento es el intercambiador aniónico que retiene las macromoléculas y la macromolécula purificada se eluye a partir del intercambiador.

El documento US 2009/0306351 divulga un regulador de lavado para uso en cromatografía de proteína A, y que comprende uno o más agentes caotrópicos como urea, y un disolvente orgánico como un modificador hidrofóbico.

50 Los procedimientos de purificación convencionales son limitados y no dan como resultado productos con niveles ultrabajos de impurezas sin gran esfuerzo. De este modo, existe una necesidad de desarrollar un método de purificación simple para alcanzar alta pureza con niveles ultrabajos de impurezas de tales productos biosintéticos a partir de sobrenadantes de cultivo, extractos celulares, extractos vegetales o lisados crudos.

55 Sumario de la invención

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona un proceso según se establece en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12. La presente invención supera los problemas y desventajas que se asocian con estrategias y diseños actuales, y proporciona nuevas herramientas y métodos para eliminación simultánea de múltiples contaminantes a partir de sobrenadantes de cultivo, extractos celulares, extractos vegetales o lisados crudos. El método puede aplicarse también a productos parcialmente purificados para reducir los contaminantes o impurezas no convenientes a niveles ultrabajos. Los niveles ultrabajos de impurezas son niveles que se reducen preferiblemente del 91% al 99,9% en comparación con sustancias no purificadas. La invención puede usarse además en conjunto con etapas de purificación adicionales para mejorar de manera adicional la pureza de la diana y reducir el nivel de contaminantes.

Se describe en la presente un proceso de purificación que comprende: poner en contacto una mezcla que contiene una sustancia diana y uno o más contaminantes con una matriz de cromatografía; lavar la sustancia diana de unión con uno o más reguladores, preferiblemente al menos uno de los cuales comprende una combinación sinérgica de un agente caotrópico o un disolvente orgánico, un detergente, y un componente de sal; proceder con la desorción de la sustancia diana de unión de la matriz, y recolectar la sustancia diana en el que la concentración del único o más contaminantes se reduce preferiblemente del 91% al 99,9% en comparación con la mezcla. Preferiblemente, la sustancia diana es uno o más de un polisacárido aniónico, una proteína aniónica, una proteína, un polisacárido, una molécula aniónica, una molécula catiónica, o un ácido nucleico, y la mezcla contiene uno o más contaminantes que derivan a partir de levaduras, bacterias, o fermentación de cultivo celular, que puede incluir componentes del medio, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y/o lipopolisacáridos.

Resulta referible además si la matriz de cromatografía constituye o contiene un adsorbente de cromatografía de intercambio aniónico, un adsorbente de cromatografía de intercambio catiónico, un adsorbente de cromatografía de interacción hidrofóbica, adsorbente de cromatografía de modo mixto o un adsorbente de cromatografía de pseudoafinidad de Cibacron-Blue o resinas. De manera alternativa, la matriz de cromatográfica puede ser una cromatografía de no absorción tal como una membrana o dispositivos de cromatografía monolíticos. De acuerdo con esto, la matriz de cromatografía puede incluir adsorbentes aniónicos, catiónicos, hidrofóbicos o de modo mixto como medio o membrana. El lavado puede incluir uno, dos, o tres reguladores, en la que el lavado se lleva a cabo de manera secuencial o de manera independiente. Preferiblemente, el primer regulador contiene isopropanol del 2 al 30%, 10 a 2000 mM de sal, y Triton X-100 del 0,01 al 1% en un pH adecuado. Preferiblemente, el segundo regulador contiene urea molar 1 a 8, 10 a 2000 mM de sal, y Triton X-100 del 0,01 al 1% en un pH adecuado. Preferiblemente, el tercer regulador contiene una concentración de sal que resulta diferente en comparación con la concentración de sal del eluyente dependiendo en parte de las características químicas o físicas de la sustancia diana y también de la matriz de cromatografía.

La diana de unión resulta desorbida preferiblemente con un eluyente que contiene una concentración de sal que resulta diferente en comparación con la concentración de sal de uno o más de los reguladores de lavado. Preferiblemente, la concentración de único o más de los contaminantes en el eluyente se reduce sustancialmente en comparación con la concentración o cantidad de contaminantes en la mezcla antes de purificación. Más preferible, la reducción resulta de al menos el 91% y más preferiblemente, se reduce del 91% al 99,9%.

Resulta preferible además si la matriz de cromatografía contiene un adsorbente de cromatografía de intercambio aniónico. Las especies aniónicas son ácidas y tienen una carga negativa. Los contaminantes, tales como lípidos, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos (por ejemplo, se cargan altamente con grupos iónicos repetitivos, como son los polisacáridos aniónicos), resultan además especies aniónicas como resultan muchas proteínas de células huésped y contaminantes del medio. El método de la invención purifica productos diana aniónicos a pesar de su similitud en cuanto a carga.

De describe además en la presente un proceso para la purificación de una diana que comprende: adsorción de una mezcla que contiene la diana y uno o más contaminantes con una matriz de cromatografía de intercambio iónico, en el que al menos el único o más contaminantes comprende una endotoxina; lavado de la diana de unión con uno o más reguladores de lavado en el que al menos un regulador de lavado contiene una combinación sinérgica de un agente caotrópico o un disolvente orgánico, un detergente y un componente de sal; desorción la diana de unión de la matriz de cromatografía; y recolección de la diana desorbida en el que el nivel de endotoxina resulta menor o igual que 3 UE/mg de diana y preferiblemente menor o igual que 2,5 UE/mg de diana. Preferiblemente, la cantidad del único o más contaminantes se encuentra en la diana desorbida y se reducen del 91% al 99,9%, y el lavado incluye solamente un regulador de lavado único.

Se describe además en la presente un sustancia diana purificada que se obtiene a partir de los métodos de la invención. Dianas preferidas incluyen, por ejemplo, un polisacárido del meningococo C, polisacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), proteína eritropoyetina recombinante, o CRM197 recombinante.

Otras realizaciones y ventajas de la invención se establecen en parte en la descripción, que sigue a continuación, y en parte, pueden resultar obvias a partir de esta descripción, o pueden aprenderse a partir de la puesta en práctica de la invención.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere al campo de purificación de productos biológicos, en particular purificación de sustancias a partir de muestras de cultivo crudas de manera tal que permanece material de niveles extremadamente bajos de contaminación. Las sustancias purificadas pueden ser, por ejemplo, proteínas, polisacáridos, virus o ácidos nucleicos que se usan en las preparaciones de medicinas para el tratamiento de enfermedades, vacunas, medicamentos terapéuticos y kits de diagnóstico y componentes, que pueden resultar útiles para humanos u otros animales.

La invención se dirige a procesos de purificación de productos que se lleva a cabo preferiblemente en una etapa para el eliminación simultánea de múltiples impurezas y, en particular, a purificación a partir de cultivos de bacterias, de levaduras, de plantas y de otras células y líquidos de manera tal que los productos finales que se obtienen contienen niveles extremadamente bajos de sustancias de contaminación. Estos contaminantes incluyen pero sin limitación uno o más de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, endotoxinas, resto celular, y lipopolisacáridos. La invención comprende procesos para purificación de un producto conveniente a partir de una mezcla tal como, por ejemplo, un lisado celular, un extracto celular, un cultivo celular u otra muestra cruda que puede resultar de origen bacteriano (procariótica) o celular (eucariótica). La molécula o sustancia diana resulta preferiblemente una proteína, polisacárido o ácido nucleico que se adsorbe o se une preferiblemente a la matriz de cromatografía. La matriz de cromatografía puede ser una forma única de material de cromatografía o una combinación de materiales, que se disponen, por ejemplo, en una configuración de tipo escalonada. La unión puede ser a través interacción iónica, hidrofóbica o hidrofílica. Matrices de cromatografía preferidas incluyen, pero sin limitación, una matriz de intercambio iónico tal como un medio de afinidad de Sefarosa, Cibacron Blue, o una matriz de cromatografía de modo mixto. El único o más lavados incluye preferiblemente uso simultáneo de urea/detergente/sal y/o disolvente/detergente/sal en los diversos lavados en la columna antes de la elución del producto conveniente. Según se describe en la presente se usan una matriz de intercambio iónico tal como Q-Sefarosa, y un agente de lavado tal como urea o isopropanol, detergente tal como Triton X-100, y sal tal como cloruro de sodio en el único o más reguladores de lavado cromatográfico. El eluido se recolecta luego y contiene sustancia diana altamente purificada con un nivel ultrabajo de impurezas. Este método puede aplicarse a polisacáridos, proteínas o ácidos nucleicos de interés que derivan a partir de líneas celulares de levaduras, de bacterias o de mamíferos recombinantes o salvajes y producto extracelular, periplasmático o intracelular. El efecto sinérgico de uso concomitante de estos componentes en reguladores de lavado permite el retiro de múltiples contaminantes durante la etapa de lavado en adsorbentes cromatográficos y conduce a producto altamente puro en el eluido.

Un proceso de purificación según se describe en la presente comprende preferiblemente las etapas de:

(1) unión de una mezcla que contiene la sustancia diana y uno o más contaminantes con una matriz de cromatografía; (2) lavado de la sustancia diana de unión con uno o más reguladores que contienen una combinación de un agente caotrópico o disolvente orgánico, un detergente, y un componente de sal; (3) desorción de la sustancia diana a partir de la matriz de cromatografía que puede ser con un regulador de elución (el eluyente); y (4) recolección de la diana en el eluido en el que el eluido contiene preferiblemente la diana con niveles ultrabajos de contaminantes. La unión incluye adsorción preferencial de la diana a la matriz a través de interacción iónica, hidrofóbica, hidrofílica o covalente. Preferiblemente los lavados se suministran de manera secuencial o cualquier lavado único puede llevarse a cabo de manera independiente. Además, uno o más de estos lavados pueden continuarse con otro lavado de regulador de sal con concentración de sal que resulta diferente en cuanto al regulador de elución antes de la elución del producto de interés, dependiendo del producto de interés. La diana se recolecta en el eluido al hacer contacto un eluyente de desorción con la matriz de cromatografía de unión a diana. El eluido resultante contiene concentraciones aumentadas de diana y concentraciones ultrabajas de contaminantes. Niveles ultrabajos de contaminantes constituyen reducciones sustanciales de impurezas que se presentaron en el material de partida (por ejemplo, la sustancia diana con impurezas). Reducciones sustanciales constituyen preferiblemente reducciones del 85% o superiores, más preferiblemente del 90% o superiores, más preferiblemente del 95% o superiores, y todavía más preferiblemente en el rango del 91% al 99,9%, e incluso más preferiblemente al grado en el que las impurezas son indetectables mediante métodos y dispositivos de detección industriales estándares y convencionales.

Una característica significativa del método de purificación consiste en el efecto sinérgico en el eliminación simultánea de múltiples contaminantes con el uso concomitante de disolvente, urea, detergente y sal durante la etapa de lavado en adsorbente cromatográfico. Contaminantes normales incluyen medio y otros componentes que se introdujeron en un cultivo para estimular el crecimiento así como también ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, y lipopolisacáridos, y cualquier otra sustancia no deseada o no conveniente que pueden presentarse en el material para purificar.

El método de la invención incluye reducción simultánea de lipopolisacárido aniónico como endotoxina así como también proteína, y contaminantes de ácido nucleico a partir de sobrenadante de cultivo a niveles ultrabajos. Una etapa de incubación no resulta siempre necesaria con anterioridad a la purificación cromatográfica, y preferiblemente no se requiere. Los niveles de endotoxina pueden reducirse a nivel ultrabajo tal como, preferiblemente, 3 UE/mg o inferior, en comparación con procesos convencionales que solo pueden alcanzar niveles bajos de endotoxina con esfuerzo considerable. Preferiblemente, los niveles de endotoxina se reducen a 2,5 UE/mg o menos, e incluso más preferiblemente a menos de 2,0 UE/mg. El método de la invención consume además menos tiempo, es rentable, y se puede reproducir en comparación con enfoques convencionales.

Se describe en la presente un proceso para purificación de un producto conveniente mediante cromatografía de intercambio iónico con tratamiento simultáneo con urea/detergente/sal y/o disolvente/detergente/sal en los diversos lavados en la columna con anterioridad a la elución del producto conveniente. Pueden usarse adsorbentes convencionales de cromatografía para purificación así como también membrana y dispositivos monolíticos. Matrices de intercambio aniónicos preferidas incluyen, pero sin limitación, Q Sefarosa, DEAE Fast Flow (GE Healthcare), y Q HyperCel (Pall Life Sciences), todas las cuales se encuentran comercialmente disponibles. Ejemplos de matrices de intercambio catiónico preferidas incluyen, pero sin limitación, S Sefarosa, CM Sefarosa, S Source (GE Healthcare, CM

5 Ceramic y S HyperCel (Pall Life Sciences). Ejemplos de adsorbentes de modo mixto incluyen, pero sin limitación, MEP, HEA PPA HyperCel (Pall Life Sciences), hidroxapatito cerámico (Bio-Rad) y MMC (GE Healthcare). Ejemplos de adsorbente de cromatografía de pseudoafinidad de ligando-colorante Cibacron blue incluyen Sefarosa azul (GE Healthcare). Ejemplos de membranas adecuadas incluyen, pero sin limitación, Q y S Sartobind y dispositivos Mustang (Sartorius y Pall Life Sciences, respectivamente), y membrana de interacción hidrofóbica Phenyl Sartobind (Sartorius). Una variedad de dispositivos de cromatografía monolíticos adecuados se disponen también (BIA Separations, Wilmington, Delaware).

10 Ejemplos de agentes caotrópicos preferidos incluyen urea, cloruro de guanidinio, arginina, y tiocianato de sodio. Ejemplos de detergentes preferidos incluyen Triton X-100, Polisorbato 20, Polisorbato 80, dodecilsulfato sódico (SDS), y sarcosina sódica. Ejemplos de aditivos orgánicos preferidos incluyen etanol, isopropanol (IPA), glicerol, etilenglicol, y propilenglicol. Ejemplos de sales preferidas incluyen cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de amonio y fosfato sódico. De nuevo, todos los agentes, detergentes, aditivos, y sales antes mencionados se conocen bien y se disponen
15 comercialmente.

Los productos que se purifican de acuerdo con el método de la invención incluyen unos que pueden obtenerse a partir de una gran variedad de fluidos biológicos incluyendo levaduras, bacterias, plantas, y fermentación de cultivo celular y, preferiblemente, sobrenadantes de células bacterianas. Preferiblemente, los productos purificados se incluyen en
20 la fabricación de proteínas terapéuticas, vacunas y pueden incluir polisacáridos aniónicos, proteínas aniónicas, y ácidos nucleicos. Productos adicionales que pueden purificarse mediante los métodos de la invención incluyen pero sin limitación, sobrenadantes de cultivo de células eucarióticas y muestras biológicas de suero y otros fluidos corporales que se utilizan en procedimientos médicos.

25 Productos bacterianos preferidos que pueden purificarse usando los métodos de la invención incluyen, por ejemplo, polisacárido alfa 2-8 ligado de *Neisseria meningitidis* serotipo B, polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serotipo C, polisacárido de Salmonella Vi, lipopolisacáridos deslipidados y lipooligosacáridos, y polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo B-PRP. Estos ejemplos son polisacáridos que se usan para preparaciones de vacunas y, por lo tanto, tienen, preferiblemente, niveles ultrabajos de impurezas para cumplir con o superar pautas que se establecen por la Administración de Alimentos y Medicamentos de U.S. y autoridades similares alrededor del mundo. Productos de proteínas preferidas que pueden purificarse usando los métodos de la invención incluyen, por ejemplo, eritropoyetina recombinante a partir de fermentación de cultivo celular y material de reacción cruzada recombinante
30 197 a partir de fermentación bacteriana.

35 De acuerdo con el método de la invención, el producto puede purificarse a partir de células que contienen producto o a partir de sobrenadante de cultivo, o ambos. Las células y sobrenadante de cultivo se separan preferiblemente ya sea mediante centrifugación o filtración tangencial. Para producto extracelular, el sobrenadante de cultivo se procesa preferiblemente, de manera directa, a través del método de invención, mientras que el producto de espacio intracelular o periplasmático, los productos se recuperan preferiblemente a partir de tanto sobrenadante de cultivo y/o células. La
40 proteína se extrae a partir de las células mediante medios químicos como choque osmótico en sacarosa o medios físicos como homogeneización. El sobrenadante de cultivo y/o extracto o lisado que contiene producto se procesa luego preferiblemente a través de la etapa de purificación cromatográfica.

45 La mayoría de los polisacáridos a partir de fermentación bacteriana y proteínas recombinantes de células de mamíferos derivan a partir de sobrenadantes mientras que otras proteínas recombinantes y ácidos nucleicos derivan a partir de células de levaduras y bacterias.

Etapa de cromatografía

50 Esta etapa de purificación comprende intercambio iónico, o adsorbente de cromatografía de modo mixto en un modo de columna o modo de lote. Por ejemplo, para intercambio iónico, puede usarse Q-Sefarosa, y adsorbente de fenil Sefarosa para interacción hidrofóbica. Cualquiera de los lavados que se mencionan a continuación o en combinación pueden suministrarse, el orden de la secuencia de lavado puede alterarse adecuadamente también.

55 Preparación de columna

Una columna se carga de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La columna se desinfecta y se equilibra con regulador de equilibrio hasta que se obtienen las bases de referencia estables para RI, absorbancia_{nm} y conductividad. Para intercambio iónico se usa regulador de equilibrio de baja molaridad adecuado con pH conveniente como regulador Tris 20 mM (pH 8) y regulador fosfato (pH 7) mientras que para interacción hidrofóbica, el regulador tiene un alto contenido de sal, por ejemplo, NaCl 2,5 M.
60

Carga de columna (muestra cruda)

65 El sobrenadante de cultivo se ajusta a conductividad conveniente y pH mediante adición de ácido/álcali/regulador/agua/sal. La columna se carga luego con sobrenadante de cultivo o lisado o extracto que

contiene muestra a una velocidad de flujo recomendada. Después de la carga, la columna se lava de nuevo con regulador de equilibrio para retirar cualquier material residual que no se une de manera estrecha con el adsorbente.

5 Lavado de columna I (disolvente)

10 La columna se lava con volúmenes de columna adecuados de regulador de lavado I que contiene detergente de isopropanol al 2-30% que comprende Triton X-100 al 0,01-1% y sal que comprende NaCl 10-2,000 mm en un regulador de equilibrio a una velocidad de flujo adecuada hasta que se obtienen bases de referencia estables para índice de refracción, absorbancia y conductividad para monitorear impurezas de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y lipopolisacáridos.

Lavado de columna II (agente caotrópico)

15 La columna se lava con volúmenes de columna adecuados de regulador de lavado II que contiene concentraciones adecuadas de agente caotrópico, urea, detergente que comprende Triton X-100 y sal que comprende NaCl en un regulador de equilibrio a una velocidad de flujo adecuada hasta que se obtienen bases de referencia estables para índice de refracción, absorbancia y conductividad se obtienen para retirar cualquiera de las impurezas de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y lipopolisacáridos.

20

Lavado de columna III (sal)

25 La columna se lava con volúmenes de columna adecuados de regulador de lavado III que contiene concentración adecuada de sal como NaCl diferente a aquella de concentración de elución en un regulador de equilibrio a una velocidad de flujo adecuada hasta que se obtienen bases de referencia estables para índice de refracción, absorbancia y conductividad para monitorear retiro de impurezas de proteínas, ácidos nucleicos y lipopolisacáridos.

Etapa de elución (producto)

30 El producto conveniente se eluye a partir de la columna con regulador de elución que contiene concentración de sal adecuada o cualquier otro agente de elución a una velocidad de flujo adecuada. La elución puede monitorearse usando índice de refracción o detección de absorbancia. Se recolectan volúmenes de columna adecuados de regulador de elución que contienen el producto conveniente. La columna puede regenerarse mediante el pase de regulador adecuado con sal y agente de desinfección como hidróxido de sodio. Retira, por lo tanto, múltiples impurezas, de naturaleza diferente, en un método simple de purificación, preferiblemente en una sola etapa, en un adsorbente de cromatografía.

35

Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones de la invención, pero no deberían verse como limitantes del alcance de la invención.

40

Ejemplos

45 Según se indica en la presente, la invención se ilustra para el método único de eliminación simultánea de múltiples impurezas a partir de muestras crudas de sobrenadante de cultivo a nivel ultrabajo mediante técnicas cromatográficas. De acuerdo con la invención, los adsorbentes de adsorción son intercambiadores aniónicos con condiciones de elución específicas de manera tal que el producto purificado que resulta exhibe un contenido muy bajo de contaminación de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y lipopolisacáridos.

50 Ejemplo 1: Polisacárido de meningococo C

El polisacárido capsular derivó a partir de fermentación bacteriana. El sobrenadante de cultivo que contiene productos se obtuvo mediante centrifugación o filtración tangencial de caldo de fermentación.

55 Adsorbente de cromatografía de intercambio aniónico: Q-Sefarosa.

Reguladores: regulador de equilibrio (regulador fosfato 20 mM pH 7,5)

Regulador de lavado I (IPA al 15% + Triton X-100 al 0,25% + NaCl 0,3 M, pH 7,5)

60 Regulador de lavado II (Urea 6 M + Triton X-100 al 0,25% + NaCl 0,3 M, pH 7,5)

Regulador de lavado III (regulador fosfato 20 mM + NaCl 0,3 M, pH 7,5)

65 Regulador de elución (regulador fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5)

Regulador de regeneración (NaCl 1 M y NaOH 0,5 M)

ES 2 743 156 T3

5 Una columna con diámetro interno de 20 cm (Pharmacia, BPG 200/500) se cargó de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando 6 L de adsorbente de Q-Sefarosa de flujo rápido de Pharmacia con una altura de lecho fijo de ~200 mm. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna (CV) de agua para inyección (WFI) y se cargó y desinfectó luego usando 5 CV de solución de cloruro de sodio 1 M con NaOH 0,5 M usando las velocidades de flujo recomendadas por el fabricante.

Carga de columna

10 El sobrenadante de cultivo se ajustó a pH 7,5 mediante adición de ácido/álcali y conductividad a ≤ 10 mS/cm mediante dilución con agua para inyección. La columna se neutralizó con regulador de equilibrio (regulador fosfato 20 mM pH 7,5), durante -15 CV hasta que se obtuvieron bases de referencia estables para A_{280nm} y conductividad. La columna se cargó luego con sobrenadante de cultivo que contiene muestra a una velocidad de flujo de 60 cm/h. Después de la carga, la columna se lavó de nuevo con 3 CV de regulador de equilibrio (regulador fosfato 20 mM pH 7,5) para retirar cualquier material residual que no se une de manera estrecha con el adsorbente.

Lavado de columna I

20 La columna se lavó con 3 CV de regulador de lavado I (IPA al 15% + Triton X-100 al 0,25% + NaCl 0,3 M, pH 7,5) a una velocidad de flujo de 60 cm/h hasta que se obtuvieron bases de referencia estables para índice de refracción, A_{280nm} y conductividad para retirar cualquiera de las impurezas de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y lipopolisacáridos.

Lavado de columna II

25 La columna se lavó con 3 CV de regulador de lavado II (Urea 6 M + Triton X-100 al 0,25% + NaCl 0,3 M, pH 7,5) a una velocidad de flujo de 60 cm/h hasta que se obtuvieron bases de referencia estables para índice de refracción, A_{280nm} y conductividad para retirar, de manera adicional, cualquiera de las impurezas de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y lipopolisacáridos.

Lavado de columna III

30 La columna se lavó con 3 CV de regulador de lavado III (regulador fosfato 20 mM + NaCl 0,3 M, pH 7,5) a una velocidad de flujo de 60 cm/h hasta que se obtuvieron bases de referencia estables para índice de refracción, A_{280nm} y conductividad para retirar, de manera adicional, cualquiera de las impurezas de proteínas, ácidos nucleicos y lipopolisacáridos.

Etapas de elución

40 El producto de polisacárido C de hombres se eluyó a partir de la columna con regulador de elución (regulador fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5) a una velocidad de flujo de -60 cm/h en la forma de un pico único de índice de refracción/ A_{224} . Continuar la elución hasta que el índice de refracción/absorbancia A_{224nm} comience a disminuir por debajo del 5% del valor del pico. Aproximadamente 2 volúmenes de columna de regulador de elución se usaron en esta etapa de elución. La columna se regeneró mediante el pase de NaCl 1M con NaOH 0,5 N.

45 El análisis de proteínas, ADN, lípidos, lipopolisacáridos, proteínas de célula huésped, ADN de célula huésped y polisacáridos diana se llevó a cabo en muestras de la carga, y los eluidos se tomaron durante la corrida cromatográfica. El polisacárido y proteína se evaluaron usando métodos estándares, el polisacárido usando el método de ácido sulfúrico fenólico, el ácido nucleico por absorbancia a 260 nm, el lípido mediante el método de orcinol y la proteína usando el método de Lowry. El ADN de célula huésped se analizó mediante PCR-RT mientras que la proteína de célula huésped se evaluó mediante ELISA. El lipopolisacárido se determinó usando un ensayo cinético turbidimétrico para endotoxina. A partir de estándares de lipopolisacáridos, el valor para muestra desconocida derivó en unidades de EU/ml. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

55

TABLA 1

| Producto | Proteína | Ácido nucleico | Lipopolisacárido | Lípido | Proteína de célula huésped | ADN de célula huésped |
|---------------------------------|----------|----------------|-------------------------------|--------|----------------------------|-----------------------|
| Carga (sobrenadante de cultivo) | 15% | 1% | 100.000 EU/mg de polisacárido | | | |

ES 2 743 156 T3

| | | | | | | |
|------------------------------------|--------|--------|-----------------------------|-------|----------|----------|
| Eluido (producto purificado) | <0,05% | <0,05% | <5 EU/mg de polisacárido | <0,3% | <5 ng/mg | <5 pg/mg |
|------------------------------------|--------|--------|-----------------------------|-------|----------|----------|

5 Según puede determinarse en la Tabla 1, la columna de Q-Sefarosa redujo el nivel de lipopolisacárido de 100000 EU/mg de polisacárido inicial a 5 EU/mg de LPS en el eluido o menos. El polisacárido diana se unió al adsorbente y el recupero fue del 70% sobre la base de resultados de ensayo. El polisacárido se eluyó de la columna en regulador fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5. El análisis mostró que la mayoría del ácido nucleico y lipopolisacárido se unió al adsorbente, pero salió durante las etapas de lavado. La mayoría de las proteínas pequeñas del medio y lípidos no se unieron con la matriz y se encontraron a través del flujo. De manera significativa, la pureza del polisacárido fue de más del 99% en el producto final.

10 Ejemplo 2: polisacárido de Haemophilus influenza tipo b (Hib)

15 El sobrenadante de cultivo que contiene producto se obtuvo mediante centrifugación o filtración tangencial de caldo de fermentación para separar células bacterianas. El sobrenadante que se obtuvo que contenía polisacárido con impurezas se procesó a través de un método de purificación de etapa única.

Cromatografía de intercambio aniónico: Adsorbente: Q-Sefarosa.

20 Reguladores: regulador de equilibrio (regulador fosfato 20 mM pH 7,5)

Regulador de lavado I (IPA al 15% + Triton X-100 al 0,25% + NaCl 0,3 M, pH 7,5)

Regulador de lavado II (Urea 6 M + Triton X-100 al 0,25% + NaCl 0,3 M, pH 7,5)

25 Regulador de lavado III (regulador fosfato 20 mM + NaCl 0,3 M, pH 7,5)

Regulador de elución (regulador fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5)

30 Regulador de regeneración (NaCl 1 M y NaOH 0,5 M)

Una columna con diámetro interno de 20 cm (Pharmacia, BPG 200/500) se cargó de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando 6 L de adsorbente de Q-Sefarosa de flujo rápido de Pharmacia con una altura de lecho fijo de ~200 mm. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna (CV) de agua para inyección (WFI) y se cargó y desinfectó luego usando 5 CV de solución de cloruro de sodio 1 M con NaOH 0,5 M usando las velocidades de flujo recomendadas por el fabricante.

35 Carga de columna

La columna se neutralizó con regulador de equilibrio (regulador fosfato 20 mM pH 7,5), durante 15 CV hasta que se obtienen bases de referencia estables para índice de refracción, A_{280nm} y conductividad. El sobrenadante de cultivo se ajustó a pH 7,5 mediante adición de ácido/álcali y conductividad a menos de o igual que 10 mS/cm mediante dilución con agua para inyección. La columna se cargó luego con sobrenadante de cultivo que contiene muestra a una velocidad de flujo de 60 cm/h. Después de la carga, la columna se lavó de nuevo con 3 CV de regulador de equilibrio (regulador fosfato 20 mM pH 7,5) para retirar cualquier material residual que no se une de manera estrecha con el adsorbente.

Lavado de columna I

50 La columna se lavó con 3 CV de regulador de lavado I (IPA al 15% + Triton X-100 al 0,25% + NaCl 0,3 M, pH 7,5) a una velocidad de flujo de 60 cm/h hasta que se obtuvieron bases de referencia estables para índice de refracción, A_{280nm} y conductividad se obtuvieron para retirar cualquiera de las impurezas de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y lipopolisacáridos.

Lavado de columna II

55 La columna se lavó con 3 CV de regulador de lavado II (Urea 6 M + Triton X-100 al 0,25% + NaCl 0,3 M, pH 7,5) a una velocidad de flujo de 60 cm/h hasta que se usaron bases de referencia estables para índice de refracción, A_{280nm} y conductividad para monitorear impurezas de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y lipopolisacáridos.

60 Lavado de columna III

La columna se lavó con 3 CV de regulador de lavado III (regulador fosfato 20 mM + NaCl 0,3 M, pH 7,5) a una velocidad de flujo de 60 cm/h hasta que se obtuvieron bases de referencia estables para índice de refracción, A_{280nm} y

conductividad para retirar, de manera adicional, cualquiera de las impurezas de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y lipopolisacáridos.

5 Etapa de elución

El polisacárido se eluyó a partir de la columna con regulador de elución (a saber, eluyente) (regulador fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5) a una velocidad de flujo de -60 cm/h en la forma de un pico único de índice de refracción/A₂₂₄. Continuar la elución hasta que el índice de refracción/absorbancia A_{224nm} comiencen a disminuir por debajo del 5% del valor del pico. Aproximadamente 2 volúmenes de columna de eluyente son necesarios en esta etapa de elución. La columna se regeneró con NaCl 1M con NaOH 0,5 N.

El proceso redujo el nivel de lipopolisacárido a menos de 3 EU/mg de polisacárido. El recupero de polisacárido fue del 60% sobre la base de resultados de ensayo, que se unió al adsorbente. El polisacárido se eluyó de la columna en regulador fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5. El análisis mostró que la mayoría del ácido nucleico y lipopolisacárido se unieron con el adsorbente, pero salieron durante las etapas de lavado. Los resultados que se alcanzaron se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

| Producto | Proteína | Ácido nucleico | Lipopolisacárido | Proteína de célula huésped | ADN de célula huésped |
|---------------------------------|----------|----------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| Carga (sobrenadante de cultivo) | 20% | 2% | 120,000 EU/mg de polisacárido | | |
| Eluido (producto purificado) | <0,5% | <0,1% | <3 EU/mg de polisacárido | <50 ng/mg | <20 pg/mg |

El análisis de proteínas, ADN, lípidos, lipopolisacáridos, proteínas de célula huésped, ADN de célula huésped y polisacáridos convenientes se llevó a cabo en muestras de la carga, y los eluidos se tomaron durante la corrida cromatográfica. El polisacárido diana y proteína residual se evaluaron usando métodos estándares, el polisacárido usando el método de ácido sulfúrico fenólico, el ácido nucleico por absorbancia a 260 nm, el lípido mediante el método de orcinol y la proteína usando el método de Lowry. El ADN de célula huésped se analizó mediante PCR-RT y la proteína de célula huésped, mediante ELISA. El lipopolisacárido se evaluó mediante ensayo cinético turbidimétrico para endotoxina. Usando estándares de lipopolisacáridos, el valor para muestra desconocida derivó en unidades de EU/ml.

La mayoría de las proteínas pequeñas del medio y lípidos se encontraron a través del flujo. Esta fracción de elución se procesó de manera adicional por diafiltración para el retiro de sal según resulta conveniente. La pureza del polisacárido fue de más del 99%.

35 Ejemplo 3: proteína eritropoyetina recombinante

El sobrenadante de cultivo que contiene producto se obtuvo mediante filtración tangencial de caldo de fermentación para separar las células. El sobrenadante que se obtuvo que contenía proteína con componentes del medio e impurezas se procesó a través de un método de purificación de etapa única. El cultivo que se usó fue línea celular de células CHO de mamífero para producción de eritropoyetina.

40 Cromatografía de interacción hidrofóbica: adsorbente: TOYOPEARL® (Toyopearl-butyl; Tosohas)

Reguladores: regulador de equilibrio (regulador fosfato 20 mM pH 7,2, NaCl 0,75 M)

45 Regulador de lavado (IPA al 19% + NaCl 0,75 M, pH 7,2)

Regulador de elución (IPA al 27% + NaCl 0,75 M, pH 7,2)

50 Regulador de regeneración (NaCl 1 M)

Una columna con diámetro interno de 20 cm (GE, BPG 200/500) se cargó de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando 6 L de adsorbente de butil-sefarosa GE con una altura de lecho fijo de ~200 mm. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna (CV) de agua para inyección (WFI) y se desinfectó luego usando 5 CV de solución de NaOH 0,5 M usando las velocidades de flujo recomendadas por el fabricante.

Carga de columna

5 La columna se neutralizó con regulador de equilibrio (IPA al 27%, regulador fosfato 20 mM pH 7,2 y NaCl 0,75 M), durante 15 CV hasta que se obtuvieron bases de referencia estables para índice de refracción, A_{280nm} y conductividad. La columna se cargó luego con sobrenadante de cultivo que contiene muestra a una velocidad de flujo de 60 cm/h. El sobrenadante de cultivo se ajustó a pH 7,2 mediante adición de ácido/álcali y conductividad a un valor mayor o igual que 200 mS/cm mediante adición de cloruro de sodio. Después de la carga, la columna se lavó de nuevo con 3 CV de regulador de equilibrio para retirar cualquier material residual que no se une de manera estrecha con el adsorbente.

Lavado de columna

15 La columna se lavó con 3 CV de regulador de lavado I (IPA al 17% + NaCl 0,75 M, pH 7,2) a una velocidad de flujo de 60 cm/h hasta que se obtuvieron bases de referencia estables para A_{280nm} y conductividad para retirar cualquiera de las impurezas de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y lipopolisacáridos.

Etapa de elución

20 La proteína se eluyó a partir de la columna con regulador de elución (regulador fosfato 20 mM, pH 7,5) a una velocidad de flujo de -60 cm/h en la forma de un pico único de A_{224} . La elución se continuó hasta que la absorbancia A_{224nm} comenzó a disminuir por debajo del 5% del valor del pico. Aproximadamente 2 volúmenes de columna de regulador de elución resultan necesarios en esta etapa de elución. La columna se regeneró mediante el pase de NaOH 1 N a través de un regulador de regeneración.

25 Según se muestra en la Tabla 3, el nivel de lipopolisacárido se redujo de 120000 EU/mg de polisacárido a 2,3 EU/mg de polisacárido o menos. El recupero de proteína fue del 80% que se une al adsorbente. La proteína se eluyó de la columna en regulador fosfato 20 mM, pH 7,5. El análisis mostró que la mayoría del ácido nucleico y polisacárido no se unió con el adsorbente, y los lipopolisacáridos de unión salieron durante las etapas de lavado.

30

TABLA 3

| Producto | Contaminación de proteína | Lipopolisacárido | Proteína de célula huésped | ADN de célula huésped |
|------------------------------|---------------------------|------------------|----------------------------|-----------------------|
| Eluido (producto purificado) | <1% | <2,3 EU/mg | <100 pg/mg | <10 pg/mg |

35 La mayoría de las proteínas pequeñas del medio y lípidos salieron durante los lavados. La pureza de la proteína fue de más del 99%.

Ejemplo 4: CRM197 recombinante.

40 La proteína recombinante CRM197, material de reacción cruzada, un mutante de toxina de difteria, derivó a partir de fermentación bacteriana. Como la proteína se localizó en espacio periplasmático, el producto se recuperó a partir de ambos sobrenadante de cultivo y células. Las células y sobrenadante de cultivo se separaron ya sea mediante centrifugación o filtración tangencial. La proteína se extrajo a partir de las células mediante medios químicos como choque osmótico en sacarosa o medios físicos como homogeneización. El sobrenadante y/o extracto que contiene producto se procesaron luego a través de etapa de purificación cromatográfica como sigue a continuación.

45 1. Cromatografía de intercambio aniónico: adsorbente: CaptoQ

Reguladores: regulador de equilibrio (regulador Tris 15 mM pH 8)

50 Regulador de lavado I (IPA al 5% + Triton X-100 al 0,05% + NaCl 0,05 M, Tris 15 mM pH 8)

Regulador de lavado II (regulador Tris 15 mM + NaCl 0,08 M, pH 8)

Regulador de elución (Tris 15 mM + NaCl 0,2 M, pH 8)

55 Regulador de regeneración (NaCl 1,5 M y NaOH 1 M)

60 Las células que se obtuvieron a partir de 20 L de fermentador se sometieron a extracción mediante choque osmótico usando sacarosa al 30%, Tris 15 mM pH 7,4, EDTA 5 mM y Tris 50 mM pH 7,4. El extracto que se filtró (45 L) se cargó en adsorbente Capto-Q en regulador Tris 10 mM pH 8,0 y se eluyó usando NaCl 0,2 M en regulador Tris 10 mM pH 8,0. Una columna con diámetro interno de 30 cm (GE, BPG 300/500) se cargó de acuerdo con las instrucciones del

ES 2 743 156 T3

fabricante usando 10 L de adsorbente Capto Q (GE). La columna se lavó con 3 volúmenes de columna (CV) de agua para inyección (WFI) y se cargó luego usando 0,5 CV de Tris 1 M pH 8 con velocidades de flujo según fueron recomendadas por el fabricante.

5 Carga de columna

La columna se equilibró con regulador de equilibrio (regulador Tris 15 mM pH 8), durante aproximadamente 1 CV hasta que se obtuvieron bases de referencia estables para $A_{280\text{nm}}$ y conductividad. La columna se cargó luego con extracto filtrado que contiene muestra a una velocidad de flujo de 212 L/h (240 cm/h). Después de la carga, la columna se lavó de nuevo con aproximadamente 1 CV de regulador de equilibrio (regulador Tris 15 mM pH 8) para retirar cualquier material residual que no se une de manera estrecha con el adsorbente.

15 Lavado de columna I

La columna se lavó con 2 CV de regulador de lavado I (IPA al 5% + Triton X-100 al 0,05% + NaCl 0,15 M, pH 7,5) a una velocidad de flujo de 240 cm/h hasta que se obtuvieron bases de referencia estables para $A_{280\text{nm}}$ y conductividad para retirar cualquiera de las impurezas de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y lipopolisacáridos. La columna se lavó de nuevo con ~2 CV de regulador de equilibrio (regulador Tris 15 mM pH 8).

20 Lavado de columna II:

La columna se lavó con 2 CV de regulador de lavado II (regulador Tris 15 mM + NaCl 0,08 M, pH 8) a una velocidad de flujo de 240 cm/h hasta que se obtienen bases de referencia estables para $A_{280\text{nm}}$ y conductividad para retirar, de manera adicional, cualquiera de las impurezas de proteínas y ácidos nucleicos.

Etapa de elución

30 El producto de proteína se eluyó a partir de la columna con regulador de elución (regulador Tris 15 mM + NaCl 0,2 M, pH 8) a una velocidad de flujo de 240 cm/h en la forma de un pico único de A_{280} . Continuar elución hasta que la absorbancia $A_{280\text{nm}}$ comience a disminuir por debajo del 5% del valor del pico. Aproximadamente 2 volúmenes de columna de regulador de elución resultaron necesarios en esta etapa de elución. La columna se regeneró mediante el pase de 2 volúmenes de columna de NaCl 1,5 M con NaOH 1 N.

35 2. Cromatografía de interacción hidrofóbica: adsorbente: fenil sefarosa

Reguladores: regulador de equilibrio (regulador fosfato 10 mM pH 7,4 + NaCl 1,5 M)

Regulador de lavado I (NaCl 1 M + regulador fosfato 10 mM pH 7,4)

40 Regulador de lavado II (NaCl 0,3 M + regulador fosfato 10 mM pH 7,4)

Regulador de elución (regulador fosfato 10 mM pH 7,4)

45 Regulador de regeneración (IPA al 20%)

El eluido IEC Capto-Q se cargó en adsorbente de fenil Sefarosa en regulador fosfato 10 mM pH 7,4 y se eluyó usando regulador fosfato 10 mM pH 7,4. Una columna con diámetro interno de 30 cm (GE, BPG 300/500) se cargó de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando 10 L de adsorbente de fenil Sefarosa (GE).

50 Carga de columna

La columna se equilibró con regulador de equilibrio (regulador fosfato 10 mM pH 7,4 + NaCl 1,5 M), durante ~1 CV hasta que se obtuvieron bases de referencia estables para $A_{280\text{nm}}$ y conductividad. La columna se cargó luego con eluido de IEC que contiene muestra a una velocidad de flujo de 150 cm/h. Después de la carga, la columna se lavó de nuevo con ~1 CV de regulador de equilibrio (regulador Tris 15 mM pH 8) para retirar cualquier material residual que no se une de manera estrecha con el adsorbente.

60 Lavado de columna I

La columna se lavó con 2 CV de regulador de lavado I (NaCl 51 M + regulador fosfato 10 mM pH 7,4) a una velocidad de flujo de 150 cm/h hasta que se obtuvieron bases de referencia estables para $A_{280\text{nm}}$ y conductividad para retirar cualquiera de las impurezas de proteínas, lípidos y lipopolisacáridos. La columna se lavó de nuevo con aproximadamente 2 CV de regulador de equilibrio.

65 Lavado de columna II

ES 2 743 156 T3

La columna se lavó con 2 CV de regulador de lavado II (NaCl 0,3 M + regulador fosfato 10 mM pH 7,4) a una velocidad de flujo de 150 cm/h hasta que se obtuvieron bases de referencia estables para $A_{280\text{nm}}$ y conductividad para retirar, de manera adicional, cualquiera de las impurezas de proteínas y lípidos.

5 Etapa de elución

El producto de proteína se eluyó a partir de la columna con regulador de elución (regulador fosfato 10 mM pH 7,4) a una velocidad de flujo de 150 cm/h en la forma de un pico único de A_{280} . Continuar la elución hasta que la absorbancia $A_{280\text{nm}}$ comience a disminuir por debajo del 5% del valor del pico. Aproximadamente 2 volúmenes de columna de regulador de elución resultan necesarios en esta etapa de elución. La columna se regeneró mediante el pase de 2 volúmenes de columna de IPA al 20%.

10 El método de purificación que incluye Capto-Q y columna de Fenil Sefarosa redujo el nivel de lipopolisacárido a 100 EU/mg de proteína o menos. El análisis mostró que los ácidos nucleicos, impurezas de proteínas, lípidos y polisacáridos salieron en los diversos lavados en adsorbente Capto-Q. La proteína purificada que resultó fue extremadamente pura debido a la combinación de dos etapas de cromatografía que incluyen etapas de lavado del método de la invención. Una etapa única de cromatografía (Capto-Q) por si sola con etapas de lavado del método de la invención conduce a más del 85% de pureza. La pureza de la proteína diana que se obtuvo fue superior al 99,9% con proteína de célula huésped menor que 100 ng por mg de proteína y ADN de célula huésped menor que 50 ng por mg de proteína.

Ejemplo 5: CRM197 recombinante con Cibacron Blue.

25 La proteína recombinante CRM197, material de reacción cruzada, un mutante de toxina de difteria, derivó a partir de fermentación bacteriana. Siendo periplasmático, el producto se recuperó a partir de extracto celular. Las células se separaron mediante cualquier centrifugación. La proteína se extrajo a partir de las células mediante medios químicos como choque osmótico en sacarosa. El extracto que contiene producto se procesó luego a través de etapa de purificación cromatográfica como sigue a continuación.

30 Cromatografía de pseudoafinidad de Cibacron Blue: adsorbente: Sefarosa azul

Reguladores: regulador de equilibrio (regulador Tris 15 mM pH 8)

35 Regulador de lavado I (IPA al 5% + Triton X-100 al 0,05% + NaCl 0,05 M, Tris 15 mM pH 8)

Regulador de lavado II (regulador Tris 15 mM + NaCl 0,2 M, pH 8)

40 Regulador de elución (Tris 15 mM + NaCl 0,5 M, pH 8)

Regulador de regeneración (Urea 8 M)

45 Las células que se obtuvieron a partir de 20 L de fermentador se sometieron a extracción mediante choque osmótico usando sacarosa al 30%, Tris 15 mM pH 7,4, EDTA 5 mM y Tris 50 mM pH 7,4. El extracto filtrado (45 L) se cargó en adsorbente de Sefarosa azul en regulador Tris 10 mM pH 8,0 y se eluyó usando NaCl 0,5 M en regulador Tris 10 mM pH 8,0. Una columna con diámetro interno de 45 cm (GE, BPG 450/500) se cargó de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando 20 L de adsorbente de Sefarosa azul (GE).

50 Carga de columna

La columna se equilibró con regulador de equilibrio (regulador Tris 15 mM pH 8), durante aproximadamente 1 CV hasta que se obtuvieron bases de referencia estables para $A_{280\text{nm}}$ y conductividad. La columna se cargó luego con extracto filtrado que contiene muestra a una velocidad de flujo de 240 L/h, a saber, 150 cm/h. Después de la carga, la columna se lavó de nuevo con aproximadamente 1 CV de regulador de equilibrio (regulador Tris 15 mM pH 8) para retirar cualquier material residual que no se une de manera estrecha con el adsorbente.

Lavado de columna I

60 La columna se lavó con 2 CV de Regulador de Lavado I (IPA al 5% + Triton X-100 al 0,05% + NaCl 0,05 M, pH 8,0) a una velocidad de flujo de 150 cm/h hasta que se obtuvieron bases de referencia estables para $A_{280\text{nm}}$ y conductividad se obtuvieron para retirar cualquiera de las impurezas de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y lipopolisacáridos. La columna se lavó de nuevo con aproximadamente 2 CV de regulador de equilibrio (regulador Tris 15 mM pH 8).

65 Lavado de columna II:

La columna se lavó con 2 CV de regulador de lavado II (regulador Tris 15 mM + NaCl 0,2 M, pH 8) a una velocidad de flujo de 150 cm/h hasta que se obtienen bases de referencia estables para A_{280nm} y conductividad para retirar, de manera adicional, cualquiera de las impurezas de proteínas y ácidos nucleicos.

5 Etapa de elución

El producto de proteína se eluyó a partir de la columna con regulador de elución (regulador Tris 15 mM + NaCl 0,5 M, pH 8) a una velocidad de flujo de 150 cm/h en la forma de un pico único de A_{280} . Continuar la elución hasta que la absorbancia A_{280nm} comience a disminuir por debajo del 5% del valor del pico. Aproximadamente 2 volúmenes de columna de regulador de elución resultaron necesarios en esta etapa de elución. La columna se regeneró mediante el pase de 2 volúmenes de columna de Urea 8 M.

15 El método de purificación que incluye columna de Sefarosa azul redujo el nivel de lipopolisacárido a 500 EU/mg de proteína o menos. El análisis mostró que los ácidos nucleicos, impurezas de proteínas, lípidos y polisacáridos salieron a través del flujo y en los diversos lavados en adsorbente Sefarosa azul. La proteína purificada que resultó fue altamente pura con una etapa de cromatografía que incluye etapas de lavado del método de la invención. Una etapa de cromatografía única por sí sola con etapas de lavado del método de la invención conduce a más del 92% de pureza con ácido nucleico inferior al 0,1%.

20 Ejemplo 6: Purificación de polisacárido con un adsorbente de modo mixto.

Polisacárido alfa 2-8 ligado de *Neisseria meningitidis* serotipo B en un adsorbente de modo mixto.

25 Regulador de equilibrio: fosfato sódico 10 mM, NaCl 25 mM, pH 7,5

Regulador de lavado I IPA al 15% + Triton X-100 al 0,25% + NaCl 0,1 M, pH 7,5

30 Regulador de Lavado II Urea 6 M + Triton X-100 al 0,25% + NaCl 0,1 M, pH 7,5

Regulador de elución acetato de sodio 25 mM + NaCl 0,5 M, pH 5,0

35 Una columna que se cargó con PPA HyperCel (Pall Life Sciences) se prepara de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se equilibra con regulador de equilibrio. Un extracto parcialmente purificado de polisacárido alfa 2-8 ligado de *Neisseria meningitidis* serotipo B en regulador 1 se cargó en la columna a 60 cm/hr. La columna se lava con regulador de equilibrio y, de manera secuencial, con reguladores de lavado I y II a 60 cm/hr. Cada lavado se continúa hasta que se alcanza una base de referencia de absorbancia e índice de refracción estable. El ácido colominico se eluye con regulador de elución.

40 Ensayos estándares se llevan a cabo para determinar la concentración de ácido colominico, proteína de célula huésped, ácido nucleico, lípido y ácido nucleico. El producto se encuentra sustancialmente libre de contaminantes.

Ejemplo 7: Purificación de una proteína básica en un intercambiador de iones catiónicos.

45 Regulador de equilibrio: fosfato sódico 50 mM + NaCl 50 mM, pH 6,0

Regulador de Lavado I fosfato sódico 50 mM + sarcosina sódica al 0,15% + NaCl 100 mM, pH 6,0

50 Regulador de Lavado II fosfato sódico 50 mM + sarcosina sódica al 0,15% + arginina 150 mM, pH 6,0.

Regulador de elución fosfato sódico 50 mM + NaCl 500 mM, pH 6,0

55 Una columna se carga con CM Ceramic (Pall Life Sciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se equilibra con regulador de equilibrio. Una lisostafina recombinante a partir de sobrenadante de *E. coli* se clarifica, diluye en regulador de equilibrio y se filtra. La lisostafina recombinante se carga en la columna a 200 cm/hr y se lava de manera adicional en regulador de equilibrio. La columna se lava luego de manera secuencial con los dos reguladores de lavado hasta que la absorbancia e índice de refracción vuelven a la base de referencia. El producto se eluye luego con el regulador de elución.

60 Ensayos estándares se llevan a cabo para determinar la concentración de proteína, proteína de célula huésped, ácido nucleico, lípido y ácido nucleico. La pureza del producto se evalúa mediante SDS PAGE y HPLC de fase inversa. La actividad específica de lisostafina se determina mediante un ensayo de eliminación de estafilococo. El producto se encuentra sustancialmente libre de contaminantes.

65 Ejemplo 8: Purificación de usando un dispositivo de intercambio iónico Q Sartobind.

Similar a los ejemplos 1 y 2 pero usando un dispositivo de intercambio iónico Q Sartobind.

Ejemplo 9: dispositivo de membrana Sartobind Phenyl.

5 Similar al ejemplo 3 pero usando un dispositivo de membrana Sartobind Phenyl.

Ejemplo 10: dispositivo de intercambio iónico monolítico

10 Similar a los ejemplos 1 y 2 pero usando un dispositivo de intercambio iónico monolítico.

Otras realizaciones y usos de la invención resultarán aparentes para aquellos expertos en el técnica a partir de la consideración de la memoria y puesta en práctica de la invención que se divulga en la presente. El término que comprende, cuando se usa, se dirige a incluir los términos que consiste de y que consiste esencialmente de. Además, los términos que comprende, que incluye, y que contiene no se dirigen a ser limitantes. Se prevé que la memoria y ejemplos se consideren a modo de ejemplo solamente.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso de purificación que comprende:
poner en contacto una mezcla que contiene una sustancia diana y uno o más contaminantes, en el que al menos uno del único o más contaminantes es una endotoxina, con una matriz de cromatografía de intercambio iónico de manera tal que la sustancia diana se une con la matriz de cromatografía;
- 10 lavar la sustancia diana de unión con al menos un regulador de lavado que contiene un primer regulador de lavado que comprende una combinación de un disolvente orgánico, un detergente y un componente de sal;
proceder con la desorción de la sustancia diana de unión de la matriz de cromatografía con un eluyente; y
- 15 recolectar la sustancia diana desorbida en el que el eluido que contiene la sustancia diana desorbida contiene no más que 3 EU/mg de endotoxina; en el que el disolvente orgánico comprende isopropanol al 2-30%, el componente de sal comprende NaCl 10-2000 mM y el detergente comprende Triton X-100 al 0,01-1%.
- 20 2. Un proceso según se reivindica en la reivindicación 1, en el que al menos un regulador de lavado comprende un segundo regulador de lavado que contiene urea, Triton X-100 y cloruro de sodio.
3. Un proceso según se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que la sustancia diana contiene al menos uno o más contaminantes.
- 25 (a) es una muestra biológica, un cultivo celular, un extracto celular, un lisado celular, un producto de fermentación, o una combinación de estos; o
(b) deriva a partir de levaduras, bacterias, o cultivo celular.
- 30 4. Un proceso según se reivindica en la reivindicación 1, en el que la sustancia diana comprende uno o más de un polisacárido aniónico, una proteína aniónica, una proteína, un polisacárido, una molécula aniónica, o una molécula catiónica; preferiblemente, en el que la diana es polisacárido de meningococo C, polisacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), proteína eritropoyetina recombinante, o CRM197 recombinante.
- 35 5. Un proceso según se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que el único o más contaminantes comprende uno o más de componentes del medio, endotoxinas, proteínas, lípidos, o lipopolisacáridos.
- 40 6. Un proceso según se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que el eluido que contiene la sustancia diana desorbida contiene no más que 2,5 EU/mg.
- 45 7. Un proceso según se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que la matriz de cromatografía es un adsorbente de cromatografía de intercambio aniónico, un adsorbente de cromatografía de intercambio catiónico, un adsorbente de cromatografía de modo mixto, una membrana, un dispositivo de cromatografía monolítico o una combinación de estos.
- 50 8. Un proceso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que la urea en el segundo regulador de lavado se encuentra a una concentración de 1-8 M.
9. Un proceso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que el Triton X-100 se encuentra a una concentración del 0,01%-1%.
10. Un proceso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que el cloruro de sodio en el segundo regulador de lavado se encuentra a una concentración de 10-2000 mM.
- 55 11. Un proceso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que el segundo regulador de lavado se encuentra a un pH de 5-9.
- 60 12. Un proceso según se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que al menos un regulador de lavado comprende un tercer regulador de lavado que tiene una concentración de sal que resulta diferente con respecto a la concentración de sal en el eluyente; preferiblemente una concentración de sal inferior con respecto a la concentración de sal en el eluyente.