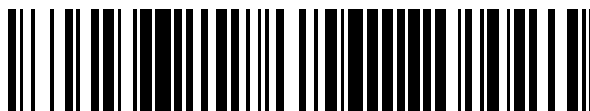


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 207**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2010 PCT/EP2010/061192**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.02.2011 WO11012726**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2010 E 10737917 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 2459715**

54 Título: **Método para purificar ADAMTS13 recombinante y otras proteínas y composiciones de las mismas**

30 Prioridad:

31.07.2009 US 230308 P

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

27.05.2020

73 Titular/es:

**BAXALTA GMBH (50.0%)
Thurgauerstrasse 130
8152 Glattpark (Opfikon), CH y
BAXALTA INCORPORATED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HASSLACHER, MEINHARD;
MITTERER, ARTUR;
FIEDLER, CHRISTIAN y
MAYER, CHRISTA**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 763 207 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

Método para purificar ADAMTS13 recombinante y otras proteínas y composiciones de las mismas

5 Campo de invención

La presente invención se refiere generalmente a métodos de purificación de proteínas similares a desintegrina A y metalopeptidasa con motivo 13 de trombospondina de tipo 1 (ADAMTS13) recombinante y otras, y composiciones que comprenden tales proteínas purificadas.

10 Antecedentes de la invención

La familia génica de metaloproteinasas, ADAM (una desintegrina y metaloproteinasas), incluye miembros que son proteasas ancladas a la membrana con diversas funciones. Los miembros de la familia ADAMTS se distinguen de los ADAM por la presencia de uno o más dominio(s) similar(es) a trombospondina 1 (TSP1) en el extremo C-terminal y la ausencia de la repetición EGF, dominio transmembrana y cola citoplasmática normalmente observados en metaloproteinasas ADAM.

La proteína similar a desintegrina A y metalopeptidasa con motivo 13 de trombospondina de tipo 1 (ADAMTS13) es un miembro de la familia ADAMTS. ADAMTS13 tiene ocho dominios de trombospondina y ningún dominio transmembrana hidrófobo. Por consiguiente, se secreta. ADAMTS13 escinde el factor de von Willebrand en el enlace Tyr1605-Met1606 y requiere iones tanto de calcio como de zinc para funcionar. ADAMTS13 también se denomina "proteasa de escisión del factor von Willebrand" y "VWFPCP".

La expresión deficiente de ADAMTS13 se ha implicado en la patogénesis de algunas enfermedades, por ejemplo, trastornos trombóticos tales como púrpura trombocitopénica trombótica (TTP, por sus siglas en inglés) (véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense n.º 20070015703). En TTP, la deficiencia y/o la inhibición de ADAMTS13 da como resultado trombosis microscópicas extensas que se forman en pequeños vasos sanguíneos en todo el cuerpo (microangiopatía trombótica). Los eritrocitos que pasan a través de los coágulos microscópicos experimentan tensión de corte, que provoca daño a la membrana de los eritrocitos, y que a su vez conduce a hemólisis intravascular y formación de esquistocitos. Las trombosis también provocan un torrente sanguíneo reducido, que puede dar como resultado daños orgánico específico. Los síntomas normalmente incluyen problemas neurológicos, tales como alucinación, conducta atípica, estado mental alterado, accidente cerebrovascular o cefaleas; insuficiencia renal; fiebre; y trombocitopenia (número de plaquetas bajo), dando como resultado hematomas o púrpura; y anemia hemolítica microangiopática, que implica anemia e ictericia. La terapia actual implica plasmaféresis para reducir los anticuerpos circulantes contra ADAMTS13 y/o reponer los niveles sanguíneos de la enzima.

Por tanto, existe una fuerte necesidad de proporcionar métodos de purificación de ADAMTS13 recombinante, particularmente en una escala de producción comercial, que puede usarse como agente terapéutico. La purificación de ADAMTS13 ha resultado difícil y se han intentado diversos enfoques, incluyendo cromatografía. Un material cromatográfico que se una a la proteína no ADAMTS13, que permita que la proteína ADAMTS13 aparezca en el eluato o sobrenadante, proporcionaría un enfoque útil para la purificación. Un material de cromatografía que se una a la proteína ADAMTS13, mientras que las impurezas que no son de ADAMTS13 o bien permanezcan en disolución o bien se unan mucho más fuertemente, también presenta un enfoque atractivo, y puede usarse en tándem con otros enfoques. La presente divulgación proporciona tales enfoques.

Además, los contaminantes virales han planteado desafíos adicionales en la purificación de proteínas ADAMTS13, así como otras proteínas y proteínas recombinantes. Un enfoque convencional implicaba tratar una muestra que iba a purificarse con una mezcla disolvente-detergente en disolución. La incubación de la muestra con los productos químicos del disolvente-detergente condujo a la desactivación de los virus recubiertos por lípidos. Este tratamiento en disolución, sin embargo, requirió de manera ineficaz la transferencia de la muestra a al menos otro recipiente, por ejemplo, para facilitar la eliminación de los productos químicos del disolvente-detergente después del tratamiento. Además, algunas proteínas que incluyen ADAMTS13 son sensibles a los productos químicos del disolvente-detergente, dando como resultado la formación de agregados. La presente divulgación proporciona un enfoque que implica la inmovilización de la proteína durante el tratamiento con disolvente-detergente para abordar tales problemas de inactivación del virus.

El documento US2006246589 (A1) se refiere a genes y proteínas y variantes de ADAMTS13, y usos de los mismos.

El documento JP2007174977 (A) se refiere a un método para separar y purificar ADAMTS13.

Sumario de invención

La invención actual se define por las reivindicaciones. Un aspecto de la descripción se refiere a un método para purificar proteína similar a desintegrina A y metalopeptidasa con motivo 13 de trombospondina de tipo 1

(ADAMTS13) recombinante (particularmente, ADAMTS13 humana) de una muestra que comprende proteína ADAMTS13 e impurezas que no son de ADAMTS13. Se ha encontrado sorprendentemente que puede usarse cromatografía con hidroxiapatita en condiciones adecuadas para purificar la proteína ADAMTS13 de las impurezas que no son de ADAMTS13. El método comprende enriquecer la proteína ADAMTS13 poniendo en contacto de manera cromatográfica la muestra con hidroxiapatita en condiciones que permitan que la proteína ADAMTS13 aparezca en un eluato de la hidroxiapatita. Es decir, la muestra se somete a cromatografía con hidroxiapatita en condiciones que permitan que la proteína ADAMTS13, preferiblemente una porción sustancial de la proteína ADAMTS13, no se una a la hidroxiapatita, mientras que se retienen las impurezas. En algunas realizaciones preferidas, la proteína ADAMTS13 recombinante se purifica del sobrenadante recogido del cultivo de células CHO que comprende ácido nucleico de ADAMTS13 recombinante. En algunas realizaciones preferidas, el rendimiento en porcentaje en el sobrenadante o eluato es sorprendentemente del 50% al 100%. El método puede comprender además cromatografía en tándem que comprende poner en contacto de manera cromatográfica el eluato de la hidroxiapatita con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto que se une a la proteína ADAMTS13. En algunas realizaciones preferidas, el rendimiento en porcentaje de ADAMTS13 después del enriquecimiento mediante cromatografía en tándem es sorprendentemente de al menos el 60%.

En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa de preparación opcional previa al enriquecimiento para concentrar ADAMTS13 en la muestra y/o unir la proteína ADAMTS13 a una resina de intercambio aniónico. Por ejemplo, el método puede comprender además poner en contacto de manera cromatográfica la muestra con una resina de intercambio aniónico y eluir la proteína ADAMTS13 de la resina de intercambio aniónico antes del contacto cromatográfico con la hidroxiapatita; y/o concentrar la proteína ADAMTS13 en la muestra mediante ultrafiltración antes del contacto cromatográfico con la hidroxiapatita; y/o estabilizar la proteína ADAMTS13 mediante intercambio de diafiltración en un tampón que comprende iones de calcio e iones de zinc antes del contacto cromatográfico con la hidroxiapatita. En algunas realizaciones preferidas, la muestra se concentra por ultrafiltración de 10 a 20 veces, el tampón se intercambia mediante diafiltración con un valor de corte molecular de 30 kDa para un tampón de baja conductividad que contiene iones de calcio y zinc, y la ADAMTS13 se une y se eluye de una resina de intercambio aniónico, tal como ANX Sepharose Fast Flow, POROS 50D o POROS 50PI, antes de la cromatografía en tándem. El conjunto de eluato de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico, en algunas realizaciones preferidas, se diluye 1:4 con tampón de dilución de hidroxiapatita para reducir la conductividad hasta 6 mS/cm antes de la cromatografía en tándem con hidroxiapatita, que comprende cromatografía con hidroxiapatita seguida por cromatografía que usa el eluato de la hidroxiapatita con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto que se une a la proteína ADAMTS13. En algunas realizaciones preferidas, el eluato de la(s) etapa(s) previas al enriquecimiento pueden proporcionar sorprendentemente un rendimiento en porcentaje de al menos el 75%.

En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa de pulido opcional mediante cromatografía de intercambio catiónico, tras el contacto cromatográfico con la hidroxiapatita o la resina de modo mixto. En tales realizaciones, tras el contacto con la hidroxiapatita o la resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba, el método puede comprender además una etapa de preparación de la proteína ADAMTS13 para el intercambio catiónico reduciendo la conductividad del tampón. En algunas realizaciones, esta etapa de preparación se realiza mediante ultrafiltración/diafiltración, mediante diálisis y/o mediante filtración en gel. En algunas realizaciones en las que se usa ultrafiltración/diafiltración, el valor de corte es de 10 kDa. En algunas realizaciones, el intercambio de tampón se lleva a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico en ANX Sepharose-FF low sub. En algunas realizaciones en las que se usa diálisis, la diálisis puede consistir en no más de 2 pases a través de un único módulo de diálisis. En algunas realizaciones preferidas, la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo en una columna Source S o columna POROS S. En algunas realizaciones preferidas, el rendimiento en porcentaje de ADAMTS13 después de reducir la conductividad del tampón es sorprendentemente de al menos el 90%, y después del pulido mediante cromatografía de intercambio catiónico, sorprendentemente de al menos el 70%.

En algunas realizaciones, el método comprende además someter la proteína ADAMTS13 a una etapa opcional de inactivación del virus, por ejemplo, para desactivar los virus y/o eliminar los virus y partículas virales. En algunas realizaciones, la etapa de inactivación del virus comprende añadir una mezcla de disolvente-detergente que comprende un detergente no iónico y un disolvente orgánico a la proteína ADAMTS13. En algunas realizaciones preferidas, la proteína ADAMTS13 se inmoviliza, por ejemplo, se inmoviliza en una resina de intercambio catiónico. En algunas realizaciones, la mezcla de disolvente-detergente comprende TRITONX-100 al 1%, fosfato de tri-N-butilo al 0,3% y TWEEN 80 al 0,3%; y/o el tratamiento con disolvente-detergente dura durante 30 minutos a de 12°C a 16°C. De manera alternativa o adicional, la etapa de inactivación del virus puede comprender filtrar la proteína ADAMTS13 con un nanofiltro para eliminar los virus y/o las partículas virales. En algunas de tales realizaciones, se lleva a cabo la nanofiltración a través de un filtro de 20 N o 35 N, antes y/o después del tratamiento con disolvente-detergente. En algunas realizaciones, la etapa de inactivación del virus se realiza después de la etapa de preparación, descrita anteriormente, y/o después de la etapa de cromatografía en tándem; y/o después del pulido mediante cromatografía de intercambio catiónico, descrito anteriormente. En algunas realizaciones preferidas, el rendimiento en porcentaje de ADAMTS13 después de la inactivación del virus es sorprendentemente de al menos el 95%.

En algunas realizaciones, el método comprende además eluir la proteína ADAMTS13 de la resina de intercambio

catiónico. En algunas realizaciones preferidas, se usa elución en gradiente, por ejemplo, elución en gradiente que comprende un primer tampón que tiene una baja concentración de sales y un segundo tampón que tiene una mayor concentración de sales. En algunas realizaciones más preferidas, se usa elución por etapas, incluso más preferiblemente, la elución por etapas implica la elución de la proteína ADAMTS13 de la resina con un tampón de almacenamiento. Por ejemplo, el tampón de almacenamiento puede tener un pH de más de 7,0 y comprender menos de 10 mM de iones de calcio, un compuesto de tamponamiento, detergente no iónico al 0,05% y una sal. En algunas realizaciones más preferidas, el método no comprende ninguna etapa de intercambio de tampón ni de concentración posterior, tras la elución de la resina con el tampón de almacenamiento.

En una realización particularmente preferida, se proporciona un método para purificar proteína ADAMTS13 recombinante de una muestra que comprende proteína ADAMTS13 e impurezas que no son de ADAMTS13, comprendiendo el método poner en contacto de manera cromatográfica la muestra con hidroxapatita en condiciones que permitan que la proteína ADAMTS13 aparezca en un eluato o un sobrenadante de la hidroxapatita; y después poner en contacto de manera cromatográfica dicho eluato con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba que se una a la proteína ADAMTS13, preferiblemente como cromatografía en tándem.

En otra realización particularmente preferida, las etapas de cromatografía descritas anteriormente están precedidas por poner en contacto de manera cromatográfica la muestra con una resina de intercambio aniónico y eluir la proteína ADAMTS13 de la resina de intercambio aniónico; y/o concentrar la proteína ADAMTS13 en la muestra mediante ultrafiltración y estabilizar la proteína ADAMTS13 mediante intercambio de diafiltración en un tampón que comprende iones de calcio e iones de zinc antes del contacto cromatográfico con la hidroxapatita.

En otra realización particularmente preferida, tras el contacto con la hidroxapatita o la resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba, el método comprende además la etapa de preparación de la proteína ADAMTS13 para el intercambio catiónico reduciendo la conductividad del tampón, en el que la etapa de preparación se realiza mediante ultrafiltración/diafiltración; y/o mediante diálisis que consiste en no más de 2 pases a través de un único módulo de diálisis; y/o mediante filtración en gel.

En todavía otra realización particularmente preferida, el método comprende obtener una muestra del sobrenadante recogido del cultivo de células CHO que comprende ácido nucleico de ADAMTS13 recombinante; poner en contacto de manera cromatográfica la muestra con una resina de intercambio aniónico y eluir la proteína ADAMTS13 de la resina de intercambio aniónico antes del contacto cromatográfico con la hidroxapatita; y/o concentrar la proteína ADAMTS13 en la muestra mediante ultrafiltración; y estabilizar la proteína ADAMTS13 mediante intercambio de diafiltración en un tampón que comprende iones de calcio e iones de zinc antes del contacto cromatográfico con la hidroxapatita; seguido por poner en contacto de manera cromatográfica la muestra con hidroxapatita en condiciones que permitan que la proteína ADAMTS13 aparezca en un eluato o un sobrenadante de la hidroxapatita; y después poner en contacto de manera cromatográfica el eluato con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba que se una a la proteína ADAMTS13; seguido por preparar la proteína ADAMTS13 para el intercambio catiónico reduciendo la conductividad del tampón, por ejemplo, mediante ultrafiltración/diafiltración; y/o mediante diálisis que consiste en no más de 2 pases a través de un único módulo de diálisis; y/o mediante filtración en gel, opcionalmente que comprende además una o más etapas de inactivación del virus. En algunas de tales realizaciones, la etapa de inactivación del virus comprende añadir una mezcla de disolvente-detergente que comprende un detergente no iónico y un disolvente orgánico a la proteína ADAMTS13, en la que la proteína ADAMTS13 se inmoviliza en una resina de intercambio catiónico y la mezcla de disolvente-detergente comprende TRITONX-100 al 1%, fosfato de tri-N-butilo al 0,3% y TWEEN 80 al 0,3%. En todavía otra realización, la etapa de inactivación del virus usa, así como o en lugar del tratamiento con disolvente-detergente, un nanofiltro para eliminar los virus y/o las partículas virales. En algunas realizaciones preferidas, el rendimiento en porcentaje de ADAMTS13 del procedimiento global descrito anteriormente es sorprendentemente del 22-24% o más, y en incluso realizaciones más preferidas, los agregados sorprendentemente se reducen en un 50%.

En algunas realizaciones en las que la ADAMTS13 se ha inmovilizado en una resina de intercambio catiónico, el método comprende además eluir la proteína ADAMTS13 de la resina usando elución por etapas con un tampón de almacenamiento que tiene un pH mayor de 7,0 y que comprende menos de 10 mM de iones de calcio, un compuesto de tamponamiento, detergente no iónico al 0,05% y una sal; o usar elución en gradiente que comprende un primer tampón que tiene un bajo contenido de sales y un segundo tampón que tiene un mayor contenido de sales.

Otro aspecto de la descripción se refiere a una composición que comprende una proteína ADAMTS13 recombinante preparada según cualquier realización de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición que comprende proteína ADAMTS13 purificada y un portador farmacéuticamente aceptable,

Todavía un aspecto adicional de la descripción se refiere a un método de inactivación de contaminantes virales en una muestra de proteína, en el que la proteína puede ser cualquier proteína de una fuente que pueda tener contaminantes virales. En realizaciones preferidas, la proteína es proteína recombinante, particularmente proteínas sensibles a la agregación cuando se exponen a disolventes orgánicos y detergentes. En algunas realizaciones, la proteína puede ser una proteína ADAMTS13, en particular ADAMTS13 recombinante, o una proteína diferente (en

particular, una proteína recombinante diferente). En algunas realizaciones, la proteína recombinante es un factor de coagulación sanguínea. En algunas realizaciones, la proteína es, por ejemplo, uno o más de factor VIII, factor II, factor VIIa, factor IX, trombina, factor de von Willebrand, anticuerpo anti-MIF u otra proteína que va a purificarse mediante cromatografía. La inactivación viral puede llevarse a cabo junto con la purificación de proteínas o no. En algunas realizaciones, el método comprende inmovilizar la proteína sobre un soporte; y tratar la proteína inmovilizada con una mezcla de detergente-disolvente que comprende un detergente no iónico y un disolvente orgánico. En algunas realizaciones preferidas, el soporte es una resina cromatográfica. En incluso realizaciones más preferidas, la mezcla de detergente-disolvente comprende Triton X-100 al 1%, fosfato de tri-N-butilo al 0,3% y polisorbato 80 al 0,3% (Tween 80). El tratamiento con la mezcla de disolvente-detergente puede continuar durante un tiempo prolongado, por ejemplo, durante de 30 minutos a 1 hora, mientras que la proteína permanezca inmovilizada sobre la resina cromatográfica, por ejemplo, en una resina de intercambio catiónico; y/o el tratamiento con disolvente-detergente puede producirse a de 2°C a 10°C. Este enfoque para la inactivación del virus puede reducir sorprendentemente la formación de agregados de proteína durante el tratamiento con una mezcla detergente-disolvente en una cantidad significativa, por ejemplo, en más del 50%, en comparación con el tratamiento con una mezcla de disolvente-detergente mientras que la proteína no está inmovilizada en disolución. En algunas realizaciones preferidas, el procedimiento se sigue por la elución de la proteína del soporte con un tampón, tal como elución en gradiente, en la que las pequeñas cantidades de agregados que se forman se eliminan adicionalmente en la última fracción de elución. En algunas realizaciones preferidas, el procedimiento se sigue por la elución de la proteína con un tampón de almacenamiento. En algunas realizaciones más preferidas, el tampón de elución comprende una concentración del 0,1% de Tween 80. En incluso algunas realizaciones más preferidas, el método no comprende ninguna etapa de intercambio de tampón ni de concentración posterior, seguido por la elución de la resina con el tampón de almacenamiento. En algunas realizaciones preferidas, los agregados sorprendentemente se reducen en un 50%.

En aún todavía otra realización particularmente preferida, se proporciona un método para inactivar contaminantes virales en una muestra de proteína, comprendiendo el método: inmovilizar la proteína en una resina cromatográfica; y tratar la proteína inmovilizada con una mezcla de disolvente-detergente que comprende Triton X-100 al 1%, fosfato de tri-N-butilo al 0,3% y polisorbato 80 al 0,3%, durante de 30 minutos a 1 hora. En algunas de tales realizaciones, el método comprende además eluir la proteína con un tampón de almacenamiento que tiene un pH mayor de 7,0 y que comprende menos de 10 mM de iones de calcio, un compuesto de tamponamiento, detergente no iónico al 0,05% y una sal.

Estos y otros aspectos de la descripción se describen en más detalle a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa un diagrama de flujo de etapas a modo de ejemplo del método para purificar proteína similar a desintegrina A y metalopeptidasa con motivo 13 de trombospondina de tipo 1 (ADAMTS13) de una muestra que comprende ADAMTS13 e impurezas que no son de ADAMTS13, según la presente invención. El orden de las etapas establecido en la figura 1 puede reordenarse y/u omitirse una o más etapas, tal como se divulga en el presente documento y tal como entiende un experto en la técnica.

Las figuras 2A-D representan variaciones en la purificación que se lleva a cabo en una columna de intercambio catiónico. La figura 2A representa un procedimiento que implica cromatografía de intercambio catiónico con elución por etapas, tras la inactivación del virus; la figura 2B representa un procedimiento que implica cromatografía de intercambio catiónico con elución por etapas, pero sin una inactivación del virus previa; la figura 2C representa un procedimiento que implica cromatografía de intercambio catiónico con elución en gradiente, seguido por inactivación del virus en la columna cromatográfica; y la figura 2D representa un procedimiento que implica cromatografía de intercambio catiónico con elución en gradiente, pero sin una inactivación del virus previa.

Descripción detallada

Un aspecto de la descripción se refiere a un método para la purificación de proteína similar a desintegrina A y metalopeptidasa y con motivo 13 de trombospondina de tipo 1 (ADAMTS13) recombinante de una muestra, que también puede comprender impurezas que no son de ADAMTS13. La muestra de proteína también puede incluir contaminantes virales, que pueden eliminarse y/o inactivarse mediante una o más etapas de inactivación del virus.

Tal como se usa en el presente documento, "proteína similar a desintegrina A y metalopeptidasa y con motivo 13 de trombospondina de tipo 1 (ADAMTS13)", "ADAMTS13", "proteína ADAMTS13", "polipéptido ADAMTS13" y "ADAMTS13 recombinante" son intercambiables (a menos que se especifique lo contrario) y se refieren a una proteína ADAMTS13 de mamífero recombinante, que también puede ser un derivado biológicamente activo o un fragmento de una proteína ADAMTS13 de longitud completa. La secuencia de aminoácidos de proteínas ADAMTS13 humanas y murinas de longitud completa tienen los respectivos números de registro UniProtKB® de Q76LX8 y Q769J6. Los detalles estructurales y la información de secuencia en ADAMTS13 humana pueden encontrarse en Zheng *et al.* ((2001) J. Biol. Chem. 276:41059-63).

El término “derivado biológicamente activo o fragmento del mismo”, tal como se usa en el presente documento, significa cualquier polipéptido con una función biológica similar, o sustancialmente similar, a la de ADAMTS13. Las secuencias polipeptídicas de los derivados biológicamente activos o fragmentos de los mismos pueden comprender delecciones, adiciones y/o sustitución de uno o más aminoácidos cuya ausencia, presencia y/o sustitución, respectivamente, no tenga ningún impacto negativo sustancial sobre una o más actividades biológicas de la proteína ADAMTS13. Por ejemplo, el corte y empalme alternativo da lugar a una especie de 130k Da que es un fragmento biológicamente activo de la proteína de longitud completa. La actividad biológica de dichos polipéptidos puede medirse mediante métodos bien conocidos, por ejemplo, métodos que someten a prueba la actividad proteolítica de ADAMTS13 en el factor de von Willebrand (vWF, por sus siglas en inglés) y/o la posterior reducción y/o retraso en los efectos aguas abajo. Por “efectos aguas abajo” quiere decirse una o más manifestaciones biológicas, bioquímicas o fisiológicas de la acción de la proteína ADAMTS13 sobre su(s) sustrato(s) nativo(s), ya sea el efecto una causa directa de la función de ADAMTS13 o bien una causa indirecta de la misma, por ejemplo, un efecto resultante de una cascada de eventos tras la actividad de ADAMTS13. Los ensayos incluyen, sin limitación, métodos que someten a prueba la reducción y/o el retraso de la adhesión de plaquetas al endotelio, la reducción y/o el retraso de la agregación de plaquetas, la reducción y/o el retraso de la formación de cadenas de plaquetas, la reducción y/o el retraso de la formación de trombos, la reducción y/o el retraso del crecimiento de trombos, la reducción y/o el retraso de la oclusión de los vasos, la escisión proteolítica de vWF (por ejemplo, FRETS-VWF73 (Peptides International, Louisville, KY)) y/o la disgregación de trombos (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 7.270.976, titulada “Methods for measuring ADAMTS13 activity and protein on platelets and in plasma”, de col. 6, línea 55 a col. 10, línea 34, y de col. 12, línea 1 a col. 18, línea 25, y 7.468.258, titulada “Self-quenching homofluorophore compositions for detecting enzyme activity” de col. 11, línea 26 a col. 16, línea 50; véase también las publicaciones de patente estadounidense n.ºs 20070015703, titulada “ADAMTS13-containing compositions having thrombolytic activity” en los párrafos [0036], [0043]-[0045] y [0053], y 20070065895, titulada “Sustrates specific to von Willebrand factor cleaving protease and method of assaying the activity”; y la solicitud europea n.º 1990421A1, titulada “Method for Detection of Condition in Consciousness Disorder Patient and Kit for the Detection”, que se refieren a ensayos para polipéptidos de ADAMTS13 y derivados y/o fragmentos de los mismos).

La ADAMTS13 recombinante, por ejemplo, ADAMTS13 humana recombinante, puede expresarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Un ejemplo específico se divulga en el documento WO 02/42441, que se refiere al método de preparación de una secuencia de nucleótidos de ADAMTS13 recombinante (véase de la página 14, línea 6 a la página 18, línea 4). En algunas realizaciones, la ADAMTS13 recombinante se produce según el siguiente procedimiento: (i) preparar una secuencia de nucleótidos de ADAMTS13 recombinante mediante ingeniería genética, por ejemplo mediante transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN; (ii) introducir la secuencia de nucleótidos de ADAMTS13 recombinante en células eucariotas, por ejemplo, mediante transfección, tal como mediante electroporación o microinyección; (iii) cultivar las células transformadas, por ejemplo, de una manera continua o discontinua; (iv) permitir la expresión de ADAMTS13 recombinante, por ejemplo, de manera constitutiva o tras la inducción; y (v) aislar las muestras que comprenden la ADAMTS13 recombinante expresada, por ejemplo, del medio de cultivo o recogiendo las células transformadas; y (vi) purificar la proteína ADAMTS13 de la muestra, según los métodos divulgados en el presente documento.

La ADAMTS13 recombinante puede producirse mediante expresión en un sistema huésped adecuado, preferiblemente un sistema huésped eucariota, y más preferiblemente un sistema caracterizado porque puede producir una molécula de ADAMTS13 farmacológicamente eficaz. Los ejemplos de células eucariotas incluyen, sin limitación, células de mamífero, tales como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep y HepG2. En una realización preferida, se usan células CHO y las células secretan la proteína ADAMTS13 recombinante en el medio de cultivo. No hay particular limitación con respecto a los reactivos o las condiciones usados para expresar de manera recombinante ADAMTS13 y puede emplearse cualquier sistema conocido en la técnica o comercialmente disponible.

“Muestra”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier composición que comprende proteína ADAMTS13 e impurezas que no son de ADAMTS13. Un experto en la técnica reconocerá que la muestra tal como se usa en el presente documento puede ser el resultado de producir ADAMTS13 recombinante tal como se describió anteriormente. Por consiguiente, la muestra puede comprender el sobrenadante recogido de células transformadas en cultivo, que expresa ADAMTS13 recombinante; tampones que comprenden ADAMTS13 en una o más etapas de un procedimiento de purificación de proteína ADAMTS13 recombinante del medio de cultivo; y/o células transformadas recogidas del cultivo celular. Alternativamente, la muestra puede ser sangre, plasma o una fracción de sangre o plasma.

En algunas realizaciones, la ADAMTS13 se purifica de una muestra que comprende 100 l de sobrenadante de cultivo celular. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que los métodos de la invención pueden escalarse según sea apropiado, por ejemplo, para producción a gran escala. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el método comprende purificar la proteína ADAMTS13 en una escala de producción comercial, por ejemplo, a partir de una muestra de al menos aproximadamente 250 l, una muestra de al menos aproximadamente 500 l o una muestra de al menos aproximadamente 1.000 l.

“Impurezas que no son de ADAMTS13”, tal como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a impurezas relacionadas con el procedimiento. Las impurezas pueden incluir, por ejemplo, impurezas de la célula

huésped (tal como proteínas contaminantes de la célula huésped, también denominadas antígenos de la célula huésped) y otras impurezas biomoleculares tales como ADN, ARN y restos celulares; componente(s) de los medios; disolventes; detergentes; y similares. De manera adicional, las impurezas que no son de ADAMTS13 también incluyen impurezas relacionadas con el producto, por ejemplo, derivados o fragmentos de proteína ADAMTS13, que no son biológicamente activos, o agregados de proteína ADAMTS13. En el caso de sangre o plasma, las impurezas que no son de ADAMTS13 pueden incluir otras proteínas encontradas normalmente en sangre o plasma, por ejemplo, albúmina, inmunoglobulinas, etc. Tal como se usa en el presente documento, “agregados” se refiere a estructuras que comprenden más de una molécula de polipéptido ADAMTS13, o más de una de cualquier otra molécula de proteína, que corresponde a estructuras de alto peso molecular o estructuras oligoméricas, tales como dímeros, trímeros y otros multímeros de la macromolécula. “Impurezas que no son de ADAMTS13” también puede incluir contaminantes virales. “Contaminantes virales” se refiere a cualquier impureza resultante de y/o derivada de un virus, incluyendo, por ejemplo, partículas de virus, proteínas de virus, ADN viral, ARN viral, o fragmentos de los mismos.

Los términos “purificación”, “purificado”, “purificar” y similares se refiere eliminar, aislar o separar la ADAMTS13 de impurezas que no son de ADAMTS13. Por ejemplo, la proteína ADAMTS13 recombinante expresada en células huésped de plantas, bacterias, levadura o mamíferos puede purificarse mediante la eliminación de impurezas que no son de ADAMTS13 que comprenden, por ejemplo, proteínas de células huésped. La pureza en porcentaje puede referirse al porcentaje de proteína ADAMTS13 frente a la proteína de la célula huésped (por ejemplo, proteína de CHO). ADAMTS13 recombinante “sustancialmente purificada” está al menos aproximadamente el 60% libre, preferiblemente al menos aproximadamente el 75% libre, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 90% libre (o aproximadamente el 95%, aproximadamente el 99% o aproximadamente el 99,9% libre) de impurezas que no son de ADAMTS13. En particular, ADAMTS13 recombinante “sustancialmente purificada” está al menos aproximadamente el 60% libre, preferiblemente al menos aproximadamente el 75% libre, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 90% libre (o aproximadamente el 95%, aproximadamente el 99% o aproximadamente el 99,9% libre) de proteínas de la célula huésped. Las proteínas de la célula huésped pueden detectarse, por ejemplo, mediante métodos inmunoquímicos que usan antisueros policlonales, tal como se comenta en más detalle a continuación.

La eliminación de contaminantes puede dar como resultado el enriquecimiento de la proteína ADAMTS13. “Enriquecimiento”, “que enriquece” y “enriquecer”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un aumento en el porcentaje de ADAMTS13 recombinante en la muestra. Por consiguiente, el enriquecimiento de la proteína ADAMTS13 se produce cuando el porcentaje de ADAMTS13 se aumenta en una muestra después de alguna manipulación de la muestra, por ejemplo, someter la muestra a una o más etapas cromatográficas. En una realización, la ADAMTS13 está suficientemente enriquecida cuando hay al menos una reducción de aproximadamente 10 veces a una reducción de aproximadamente 115 veces de impurezas que no son de ADAMTS13, particularmente proteínas de la célula huésped. En una realización, la ADAMTS13 está suficientemente enriquecida cuando hay al menos una reducción de aproximadamente 20 veces (por ejemplo, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 60 veces, aproximadamente 70 veces, aproximadamente 80 veces, aproximadamente 90 veces, aproximadamente 100 veces, etc.) de impurezas que no son de ADAMTS13, y en particular, la reducción se produce con respecto a las proteínas de la célula huésped.

Un experto en la técnica será capaz de usar métodos disponibles en la técnica para determinar la reducción en veces de impurezas que no son de ADAMTS13, particularmente proteínas de la célula huésped. Por ejemplo, puede usarse un ensayo para impurezas que no son de ADAMTS13. En una realización, la muestra es sobrenadante acondicionado recogido del cultivo de células transformadas que expresan ADAMTS13 recombinante, y el ensayo para determinar la reducción en veces de impurezas que no son de ADAMTS13 mide los niveles de proteínas de la célula huésped. En una realización particular, las células transformadas son células CHO transformadas, y el ensayo es un análisis serológico de inmunoabsorción ligado a una enzima que mide las proteínas CHO. La reducción en veces de impurezas que no son de ADAMTS13 puede calcularse, por ejemplo, como la cantidad de impurezas que no son de ADAMTS13 en la muestra con respecto a la cantidad de impurezas que no son de ADAMTS13 eluidas, como el nivel de impurezas en una carga (por ejemplo, en ppm) dividido por el nivel de impurezas en el eluato (por ejemplo, en ppm).

Las proteínas de la célula huésped pueden detectarse, por ejemplo, mediante métodos inmunoquímicos que usan antisueros policlonales contra componentes proteicos de la célula huésped y/o el sistema de vector recombinante usado para elaborar ADAMTS13. En general, los antisueros pueden alzarse contra el antígeno derivado de la célula huésped, en el que la célula huésped comprende un vector de expresión que se usa en el procedimiento de elaboración pero que carece del gen que codifica para ADAMTS13. Las impurezas de la célula huésped pueden extraerse usando el/los método(s) idéntico(s) y/o sustancialmente similar(es) a los descritos en el presente documento. Los antígenos de la célula huésped purificados (o parcialmente purificados) obtenidos usando el/los método(s) idéntico(s) y/o sustancialmente similar(es) a los descritos en el presente documento pueden usarse luego para la preparación de antisueros contra los componentes proteicos de la célula huésped y el sistema de vector recombinante usado para elaborar ADAMTS13. Las proteínas de la célula huésped pueden detectarse usando los antisueros en un inmunoensayo, por ejemplo, en un ELISA o mediante análisis por inmunotransferencia de tipo

Western. Las impurezas de la proteína de la célula huésped también pueden detectarse mediante la separación de la muestra que va a analizarse mediante electroforesis en gel en 2D y tinción con plata y/o tinción con oro coloidal para detectar las proteínas presentes. También puede usarse HPLC para cuantificar los niveles de impurezas de la célula huésped; sin embargo, los métodos de HPLC no son tan sensibles como los inmunoensayos o los métodos de tinción con plata. Preferiblemente, las impurezas de la célula huésped se reducen hasta por debajo de los niveles detectables usando, por ejemplo, uno o más de estos métodos analíticos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” indica un intervalo aproximado de más o menos el 10% de un valor especificado.

Enriquecimiento de ADAMTS13

En general, la descripción proporciona un método de purificación de proteína ADAMTS13 recombinante (preferiblemente proteína ADAMTS13 humana) de una muestra que comprende proteína ADAMTS13 e impurezas que no son de ADAMTS13, en el que el método comprende poner en contacto de manera cromatográfica la muestra con (i) hidroxapatita o (ii) hidroxapatita y una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto en tándem, de manera que se enriquece la cantidad de ADAMTS13 en la muestra. “Poner en contacto de manera cromatográfica”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a poner en contacto una muestra u otra mezcla que va a separarse con una resina cromatográfica usando cualquier modo de cromatografía descrito en el presente documento y/o conocido en la técnica. Los modos incluyen, sin limitación, modo discontinuo y cromatografía en columna. El contacto se efectúa exponiendo y/o incubando la muestra sobre, en o dentro de la resina, filtrando la muestra a través de la resina o mediante cualquier otro medio. El tampón usado para la cromatografía a menudo es un tampón fosfato.

En algunas realizaciones, la muestra se pone en contacto de manera cromatográfica con hidroxapatita en condiciones que permitan que la proteína ADAMTS13 aparezca en el eluato de la hidroxapatita. Por “en condiciones” se refiere a uno o más parámetros o variables en los que se lleva a cabo la cromatografía, incluyendo, por ejemplo, altura de columna, relleno, tampón (pH, concentración de sales, fuerza iónica, etc.), temperatura, presión, y similares. Es decir, la muestra se somete a cromatografía con hidroxapatita en condiciones que permitan que la proteína ADAMTS13, preferiblemente una porción sustancial de la proteína ADAMTS13 en la muestra, no se una a la hidroxapatita. Si se usa cromatografía en columna, la proteína ADAMTS13, preferiblemente una porción sustancial de la misma, fluirá a través de la columna, enriqueciéndose de ese modo en ADAMTS13 el tampón que sale de la columna, como la fracción o el eluato que fluye a través, mientras que se retienen las impurezas que no son de ADAMTS13. Si se usa cromatografía discontinua, el sobrenadante o la fracción de sobrenadante comprenderá la proteína ADAMTS13 o una porción sustancial de la misma. “Eluato” se usa de manera intercambiable en el presente documento con “flujo a través”, “fracción de flujo a través”, “sobrenadante” o “fracción de sobrenadante”. El eluato (o sobrenadante) puede recogerse. Tal recogida se produce, por ejemplo, mediante centrifugación, sedimentación, filtración, etc. de la resina cromatográfica después de que la muestra se exponga a la resina y complete la incubación. El eluato (o sobrenadante) recogido de la hidroxapatita puede someterse además a una o más etapas según la invención.

En algunas realizaciones, por ejemplo, el método comprende además poner en contacto de manera cromatográfica el eluato de la hidroxapatita con una resina de modo mixto, tal como una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba, que se une a la proteína ADAMTS13. Es decir, la muestra de proteína ADAMTS13 puede someterse a cromatografía en tándem, en primer lugar, con hidroxapatita, preferiblemente en condiciones en las que una porción sustancial de proteína ADAMTS13 no se una a la hidroxapatita, seguido por cromatografía con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto que se une a la proteína ADAMTS13. Los detalles adicionales en cuanto a la etapa de cromatografía con hidroxapatita, y la etapa opcional en tándem de cromatografía de modo mixto usando una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba, se proporcionan a continuación.

(a) Cromatografía con hidroxapatita

La etapa de cromatografía con hidroxapatita implica cualquier método de cromatografía con hidroxapatita, tal como se describe en el presente documento, tal como se conoce en la técnica, o tal como puede apreciar un experto en la técnica, especialmente a la luz de las divulgaciones en el presente documento. Los métodos de cromatografía con hidroxapatita son bien conocidos en la técnica. La hidroxapatita tiene una fórmula química de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y es un constituyente principal de mineral óseo y dental, así como de otras estructuras biológicas. La hidroxapatita puede obtenerse de tales fuentes naturales o puede sintetizarse mediante métodos bien conocidos. La hidroxapatita se usa ampliamente como un medio o soporte cromatográfico, particularmente para separaciones cromatográficas de proteínas. El tamaño de partícula generalmente no es crítico y puede variar ampliamente. Los tamaños de partículas típicos oscilan desde aproximadamente 1 μm hasta aproximadamente 1.000 μm en diámetro, preferiblemente desde aproximadamente 10 μm hasta aproximadamente 100 μm en diámetro. La porosidad también puede variar ampliamente. En realizaciones preferidas, el diámetro de poro promedio oscila desde aproximadamente 100 Å hasta aproximadamente 10.000 Å, más preferiblemente desde aproximadamente 500 Å hasta aproximadamente 3.000 Å, incluso más preferiblemente de 500 Å a 3.000 Å.

Diversos medios cromatográficos de hidroxiapatita están disponibles comercialmente, y cualquier forma disponible del material puede usarse en la práctica de los métodos divulgados en el presente documento. Los ejemplos no limitativos de material de hidroxiapatita cerámica comercialmente disponible que puede usarse incluyen MACRO-PREP™, hidroxiapatita de los tipos I y II (Biorad, Hercules, CA) y HA ULTROGEL® (PALL, Ann Arbor, MI). En una realización, la muestra se somete a cromatografía con hidroxiapatita de tipo II (Biorad, Hercules, CA).

Sorprendentemente, se descubrió que tras poner en contacto de manera cromatográfica una muestra con hidroxiapatita, una porción significativa o sustancial de impurezas que no son de ADAMTS13 en la muestra se une a la hidroxiapatita, mientras que una porción significativa o sustancial de la proteína ADAMTS13 permanece en disolución. Por consiguiente, tal como se comentó anteriormente, el tratamiento de la muestra con hidroxiapatita puede realizarse en modo discontinuo o en modo de cromatografía en columna según los métodos bien conocidos, y recogerse proteína ADAMTS13 suficientemente enriquecida en el sobrenadante o en el eluato, respectivamente.

Tal como se usa en el presente documento, "porción sustancial" se refiere a un rendimiento de recuperación en el sobrenadante o eluato de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 100% (por ejemplo, de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 90%, por ejemplo, de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 80%, por ejemplo, de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 70%) de proteína ADAMTS13 recombinante de la muestra en comparación con la anterior a la etapa de cromatografía con hidroxiapatita. Por ejemplo, el rendimiento de recuperación en el sobrenadante o eluato de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 100% indica que la muestra se sometió a cromatografía con hidroxiapatita en condiciones que permiten que una porción sustancial de proteína ADAMTS13 fluya a través.

En realizaciones preferidas, la muestra que va a someterse a cromatografía con hidroxiapatita tiene una baja conductividad, por ejemplo, entre aproximadamente 3 mS/cm y aproximadamente 15 mS/cm a temperatura ambiente, preferiblemente menos de aproximadamente 10 mS/cm a temperatura ambiente. En una realización, la muestra tiene una conductividad de 6 mS/cm a temperatura ambiente. En otra realización, la muestra tiene una conductividad de 7 mS/cm a temperatura ambiente. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que la conductividad de la muestra puede ajustarse con una disolución de sales que comprenda sales neutras, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, y similares, y tamponarse adecuadamente con aproximadamente tampón fosfato 20 mM. La muestra preferiblemente tiene un pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 9,0, y preferiblemente, tiene un pH entre 7 y 8. La muestra puede permanecer en contacto con la hidroxiapatita durante cualquier periodo de tiempo que permita una unión suficiente de las impurezas que no son de ADAMTS13, por ejemplo, durante de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 24 horas. La ADAMTS13 enriquecida puede recogerse en la fracción de sobrenadante o la fracción de flujo a través, que puede incluir el eluato de lavados posteriores, particularmente el primer lavado.

En una realización, someter la muestra a cromatografía con hidroxiapatita en condiciones que permiten que una porción sustancial de proteína ADAMTS13 permanezca en el sobrenadante o eluato da como resultado ADAMTS13 enriquecida, por ejemplo, una reducción de aproximadamente 10 veces a una reducción de aproximadamente 115 veces de impurezas que no son de ADAMTS13, particularmente proteínas de la célula huésped, en comparación con la muestra antes de la cromatografía con hidroxiapatita. En una realización, la cromatografía con hidroxiapatita reduce las proteínas de la célula huésped en la muestra en al menos aproximadamente 20 veces (por ejemplo, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 60 veces, aproximadamente 70 veces, aproximadamente 80 veces, aproximadamente 90 veces, por ejemplo, aproximadamente 100 veces, etc.).

En realizaciones preferidas, someter la muestra a cromatografía con hidroxiapatita en condiciones que permiten que una porción sustancial de proteína ADAMTS13 permanezca en el sobrenadante o eluato da como resultado una eliminación de impurezas que no son de ADAMTS13 de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 99%, particularmente proteínas de la célula huésped. En una realización, someter la muestra a cromatografía con hidroxiapatita da como resultado una eliminación de impurezas que no son de ADAMTS13 de al menos aproximadamente el 90% (por ejemplo, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99%, aproximadamente el 99,5%, etc.), particularmente la eliminación de proteínas de la célula huésped. Por consiguiente, los métodos divulgados en el presente documento que comprenden enriquecer la proteína ADAMTS13 sometiendo la muestra a cromatografía con hidroxiapatita en condiciones que permiten que una porción sustancial de la proteína ADAMTS13 permanezca en el sobrenadante o eluato también pueden proporcionar un tampón que comprende proteína ADAMTS13 que está sustancialmente purificada.

Las condiciones de columna a modo de ejemplo que permiten que una porción sustancial de ADAMTS13 fluya a través de una columna de cromatografía con hidroxiapatita se proporcionan en los ejemplos a continuación. En general, para permitir que una porción sustancial de proteína ADAMTS13 fluya a través durante la cromatografía con hidroxiapatita, la columna de cromatografía preferiblemente tendrá una altura de lecho de entre aproximadamente 5 cm y aproximadamente 30 cm, por ejemplo, de 20 cm a 30 cm. De manera adicional, antes de someter la muestra

a cromatografía con hidroxiapatita, por ejemplo, antes de cargar la muestra en la columna con hidroxiapatita, la columna puede, en primer lugar, lavarse, activarse y/o equilibrarse respectivamente con tampones de lavado, activación y/o equilibrio bien conocidos, particularmente los sugeridos por el fabricante de la hidroxiapatita. En una realización, la columna se activa y equilibra con el mismo tampón, por ejemplo, un tampón que comprende Na/K PO₄ 20 mM, que tiene un pH de 7,0 y que tiene una conductividad de 5,5 mS/cm a temperatura ambiente.

(b) Cromatografía intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto

En una realización, la proteína ADAMTS13 se enriquece mediante cromatografía en tándem con la hidroxiapatita seguida por una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto que se une a la proteína ADAMTS13. Se ha descubierto sorprendentemente que la ADAMTS13 se une a la resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto mientras que las impurezas que no son de ADAMTS13 o bien permanecen en disolución o bien se unen mucho más fuertemente a la resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto. Por consiguiente, el tratamiento de la muestra con hidroxiapatita seguido por el tratamiento con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto puede realizarse en modo discontinuo sucesivo o en modo de cromatografía en columna sucesivo según métodos bien conocidos, y puede recogerse proteína ADAMTS13 suficientemente enriquecida en la fracción de sobrenadante final o conjunto de eluato final después de someter la muestra a cromatografía en tándem en modo discontinuo o cromatografía en tándem en columna, respectivamente. Por consiguiente, tal como se describe en el presente documento, la proteína ADAMTS13 se enriquece sometiendo la muestra a cromatografía con hidroxiapatita en condiciones que permitan que una porción sustancial de proteína ADAMTS13 permanezca en el sobrenadante o fluya a través de una columna que comprende hidroxiapatita como eluato. Después del tratamiento con hidroxiapatita, el sobrenadante o eluato recogido que comprende ADAMTS13 enriquecida opcionalmente se somete a cromatografía en modo discontinuo o en columna con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto. En una realización, el sobrenadante o eluato de la etapa con hidroxiapatita se alimenta en una columna de cromatografía que comprende la resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto. La cromatografía en modo discontinuo o en columna con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto puede llevarse a cabo mediante cualquier método descrito en el presente documento, conocido en la técnica, o tal como puede apreciar un experto en la técnica, especialmente a la luz de las divulgaciones en el presente documento. Una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto preferida, adecuada para su uso después de la cromatografía con hidroxiapatita, es la matriz a base de Sepharose que comprende un ligador hidrófilo. El ligador hidrófilo puede comprender un ligando funcional, por ejemplo, mediante un grupo tioéter. El ligando hidrófilo puede estar cargado negativamente y puede comprender además un grupo hidrófobo, por ejemplo, un hidrocarburo. Un ligando hidrófilo que comprende además un grupo hidrófobo puede crear un ligando de modo mixto, es decir, un ligando con funcionalidad multimodal, adecuado para realizar cromatografía de modo mixto, tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la capacidad iónica de la resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto puede estar entre aproximadamente 0,07 mM/ml y aproximadamente 0,09 mM/ml y tener una estabilidad de pH entre aproximadamente 2 y aproximadamente 14. En general, la ADAMTS13 se unirá a la resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto mediante enlaces iónicos, puentes de hidrógeno y/o enlaces hidrófobos.

Los ejemplos de resinas de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto comercialmente disponibles que pueden usarse según los métodos descritos en el presente documento incluyen, sin limitación, medio CAPTO™ MMC (GE Healthcare) y SampliQ SAX (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto es CAPTO™ MMC. CAPTO™ MMC es un intercambiador catiónico débil multimodal a base de agarosa rígida, altamente reticulada y en forma de perlas con un tamaño de partícula medio de aproximadamente 75 µm. Comprende ligandos con funcionalidad multimodal que se unen a proteínas a altas concentraciones de sales. Tiene una velocidad de flujo típica de aproximadamente 600 cm/h para una columna de aproximadamente 1 m de diámetro, con una altura de lecho de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 20 cm a aproximadamente 20°C, que usa tampones de procesamiento con aproximadamente la misma viscosidad que el agua a menos de aproximadamente 3 bar (aproximadamente 0,3 MPa).

Durante la cromatografía con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto, la ADAMTS13 se une a la resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto y se aísla adicionalmente de las impurezas que no son de ADAMTS13 (por ejemplo, proteínas de la célula huésped presentes en el enriquecimiento previo de la muestra). Cuando la etapa de cromatografía de modo mixto se realiza en una columna, la resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba absorbe la proteína ADAMTS13, mientras que las impurezas que no son de ADAMTS13 contaminantes se eliminan de la corriente del procedimiento y se separan de la proteína ADAMTS13 en la muestra fluyendo a través de la columna de cromatografía.

A continuación, se lava la resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto a la que se adsorbe la ADAMTS13, por ejemplo, para eliminar contaminantes o impurezas holgadamente unidos y/o para ajustar la conductividad del tampón en la preparación para la elución de ADAMTS13 de la resina. Es decir, después de que la muestra se pone en contacto de manera cromatográfica con la hidroxiapatita, y el sobrenadante o eluato recogido que comprende la ADAMTS13 se pone en contacto de manera cromatográfica con la resina catiónica/interacción

hidrófoba de modo mixto y se adsorbe a la misma, la resina catiónica/interacción hidrófoba de modo mixto se lava con tampón de lavado. En general, el tampón de lavado comprenderá un ion fosfato de tamponamiento y una sal neutra, y tendrá un pH alto tal que la unión de ADAMTS13 a la resina catiónica/interacción hidrófoba de modo mixto se debilita a medida que aumentan parámetros relevantes del tampón, por ejemplo, con la concentración de sales y/o el pH del tampón crecientes. En una realización, la resina catiónica/interacción hidrófoba de modo mixto unida a ADAMTS13 se lava en primer lugar con un tampón de equilibrio, por ejemplo, comprendiendo el tampón de equilibrio aproximadamente fosfato 20 mM y aproximadamente NaCl 25 mM, y que tiene un pH de aproximadamente 7,0 a temperatura ambiente. Los lavados posteriores pueden realizarse con un tampón de lavado, que comprende, por ejemplo, aproximadamente fosfato 20 mM, aproximadamente NaCl 80 mM y que tiene un pH de aproximadamente 8,0 a temperatura ambiente. La resina catiónica/interacción hidrófoba de modo mixto unida a ADAMTS13 puede someterse a un lavado final con un tampón que comprende, por ejemplo, Na/K PO₄ 50 mM y NaCl 160 mM, y que tiene un pH de 8,0 y una conductividad de 16,5 mS/cm a temperatura ambiente.

Después de la cromatografía con hidroxiapatita, seguida por cromatografía con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto que se une a la proteína ADAMTS13 y lavado opcional, la proteína ADAMTS13 recombinante se eluye de la resina de cromatografía de modo mixto con un tampón de elución. En general, el tampón de elución comprenderá de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM de iones de tamponamiento, por ejemplo, de 20 mM a 50 mM de iones de tamponamiento. Los tampones a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, fosfato, tris, HEPES, imidazol, histidina, MES, citrato, Gly-Gly, tris/acetato, y similares. El tampón de elución también comprende generalmente cationes monovalentes o divalentes, tales como, pero no limitados a, iones de sodio, potasio o calcio, preferiblemente a altas concentraciones en forma de sales (por ejemplo, con aniones Cl, PO₄, SO₄ o OAc, y similares). En una realización preferida, el tampón de elución comprende iones de sodio a alta concentración, por ejemplo, mayor de aproximadamente Na⁺ 700 mM. El tampón de elución puede tener un pH que oscila desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 11. En una realización, el tampón de elución comprende Na/K PO₄ 50 mM, NaCl 1.000 mM y tiene un pH de 8,0 y una conductividad de 93 mS/cm a temperatura ambiente.

Las condiciones a modo de ejemplo que permiten que la ADAMTS13 enriquecida obtenida de una columna de hidroxiapatita se unan a una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto en una columna y se aislen de impurezas que no son de ADAMTS13 se proporcionan en los ejemplos a continuación. En general, la altura de lecho de la columna de cromatografía de intercambio catiónico/hidrófoba de modo mixto puede ser de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 100 cm, o incluso mayor dependiendo del volumen de muestra. Además, la razón del volumen de la columna de cromatografía con hidroxiapatita con respecto al volumen de la columna de la columna de cromatografía de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto puede ser de aproximadamente 10:1, dependiendo de, por ejemplo, las cantidades de impurezas que no son de ADAMTS13 en la muestra en comparación con la cantidad de ADAMTS13.

De manera adicional, un experto en la técnica reconocerá que, para las realizaciones que comprenden cromatografía en tándem con hidroxiapatita y una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto, las resinas y los tampones usados para el lavado, la activación y/o el equilibrio se seleccionarán en determinadas realizaciones para que sean compatibles con ambas columnas. En una realización, las columnas se activan de manera separada. En otra realización, las columnas se equilibran, cargan y lavan una vez en tándem, seguido por uno o más lavados o eluciones segundos o posteriores aplicados sólo a la resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto. En una realización, los tampones para activar y equilibrar la columna de cromatografía de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto son los mismos que los usados para activar y equilibrar la columna con hidroxiapatita. En una realización, el tampón para activar y equilibrar la columna de cromatografía de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto es un tampón que comprende Na/K PO₄ 20 mM y que tiene un pH de 7,0 y una conductividad de 5,5 mS/cm a temperatura ambiente.

En realizaciones preferidas, la muestra se somete a cromatografía en tándem con hidroxiapatita y resinas de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto en condiciones que permitan que una porción sustancial de proteína ADAMTS13 fluya a través de la resina de hidroxiapatita, seguido por que se una y luego se eluya de la resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto. En realizaciones más preferidas, esta cromatografía en tándem da como resultado ADAMTS13 suficientemente enriquecida. En algunas realizaciones, someter una muestra, por ejemplo, sobrenadante acondicionado recogido del cultivo de células huésped transformadas que expresan ADAMTS13 recombinante, que puede estar enriquecido previamente, a la cromatografía en tándem descrita en el presente documento proporciona ADAMTS13 de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 80% (por ejemplo, entre aproximadamente el 45% y aproximadamente el 75%, por ejemplo, entre aproximadamente el 50% y aproximadamente el 70%, por ejemplo, de aproximadamente el 55% a aproximadamente el 65%) y/o de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 90% de actividad (por ejemplo, entre aproximadamente el 45% y aproximadamente el 85%, por ejemplo, entre aproximadamente el 50% y aproximadamente el 80%, por ejemplo, de aproximadamente el 55% a aproximadamente el 75%).

En algunas realizaciones, la cromatografía en tándem elimina de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 99% de impurezas de la célula huésped. En una realización, la cromatografía en tándem tal como se describe en el presente documento aumenta la pureza de ADAMTS13 en al menos aproximadamente 600 veces, por ejemplo, en

al menos aproximadamente 650 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 700 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 800 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 900 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 1.000 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 1.100 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 1.200 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 1.300 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 1.400 veces, o en al menos aproximadamente 1.500 veces en comparación con la pureza de ADAMTS13 antes de someter la muestra a cromatografía en tándem.

En algunas realizaciones, someter una muestra, por ejemplo, sobrenadante acondicionado recogido del cultivo de células huésped transformadas que expresan ADAMTS13 recombinante, que pueden enriquecerse previamente, preferiblemente mediante UF/DF y/o intercambio aniónico, a la cromatografía en tándem descrita en el presente documento da como resultado una muestra con de aproximadamente 600 a aproximadamente 1.500 ppm de impurezas que no son de ADAMTS13 (por ejemplo, antígenos de la célula huésped). Por ejemplo, la cromatografía en tándem puede dar como resultado una muestra con de aproximadamente 750 a aproximadamente 1250 ppm de impurezas que no son de ADAMTS13, preferiblemente una muestra con menos de aproximadamente 1.000 ppm de impurezas que no son de ADAMTS13.

En algunas realizaciones, la cromatografía en tándem da como resultado una reducción de aproximadamente 1.000 veces a una reducción de aproximadamente 3.000 veces de impurezas que no son de ADAMTS13 (en particular, antígenos de la célula huésped) en comparación con la muestra antes de la cromatografía en tándem. En algunas realizaciones, someter el sobrenadante acondicionado recogido del cultivo de células huésped transformadas que expresan ADAMTS13 recombinante, que puede estar enriquecido previamente, a la cromatografía en tándem descrita en el presente documento reduce las impurezas que no son de ADAMTS13 (por ejemplo, antígenos de la célula huésped) en al menos aproximadamente 1.000 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 1.300 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 1.500 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 2.000 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 2.500 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 3.000 veces, etc.

Por consiguiente, en realizaciones preferidas, el tampón de elución de la resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto, que comprende ADAMTS13 recombinante, proporciona una composición que comprende proteína ADAMTS13 que está sustancialmente purificada.

Preparación previa al enriquecimiento de la muestra

En algunas realizaciones, el método divulgado en el presente documento comprende además preparar la muestra que comprende ADAMTS13 para el enriquecimiento mediante cromatografía con hidroxiapatita o cromatografía en tándem con hidroxiapatita y resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto. En esta etapa opcional previa al enriquecimiento, la ADAMTS13 en la muestra puede, cualquiera o ambos, (a) concentrarse mediante ultrafiltración/diafiltración (UF/DF); y/o (b) ponerse en contacto de manera cromatográfica con una resina de intercambio iónico, a la que se une ADAMTS13 y de la que se eluye posteriormente.

(a) Ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) previa al enriquecimiento

En una etapa opcional previa al enriquecimiento, la ADAMTS13 en una muestra se concentra mediante ultrafiltración previa al enriquecimiento, y el tampón de la muestra se intercambia mediante diafiltración. La etapa de ultrafiltración/diafiltración previa al enriquecimiento normalmente se realiza antes del enriquecimiento de ADAMTS13 mediante cromatografía con hidroxiapatita o cromatografía en tándem con hidroxiapatita seguida por una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto tal como se describió anteriormente. La etapa de ultrafiltración/diafiltración previa al enriquecimiento normalmente se realiza antes de cualquier cromatografía de intercambio aniónico previa al enriquecimiento (si se realiza). Esta etapa de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) previa al enriquecimiento puede ser eficaz en la eliminación de componentes de peso molecular pequeño, por ejemplo, componentes de peso molecular pequeño de los medios de cultivo celular. Tales componentes pueden unirse a una columna de cromatografía posterior y disminuir la capacidad de la columna para ADAMTS13. Por consiguiente, la UF/DF previa al enriquecimiento puede optimizar la carga para las etapas de cromatografía posteriores. En una realización, se eliminan los componentes de peso molecular pequeño por debajo de aproximadamente 30 kDa, o al menos una porción sustancial de los mismos. En algunas realizaciones, los componentes de peso molecular pequeño eliminados (o sustancialmente eliminados) son componentes de por debajo de aproximadamente 60 kDa, por debajo de aproximadamente 55 kDa, por debajo de aproximadamente 50 kDa, por debajo de aproximadamente 45 kDa, por debajo de aproximadamente 40 kDa, por debajo de aproximadamente 35 kDa, por debajo de aproximadamente 30 kDa, por debajo de aproximadamente 25 kDa, por debajo de aproximadamente 20 kDa, etc.

La etapa de ultrafiltración/diafiltración previa al enriquecimiento también se usa en determinadas realizaciones para intercambiar ADAMTS13 en una disolución de tampón apropiada para el procesamiento posterior y/o para concentrar adicionalmente la muestra. En una realización, la disolución de tampón apropiada es un tampón de baja conductividad apropiado para cromatografía de intercambio aniónico previa al enriquecimiento, si tal cromatografía de intercambio aniónico va a realizarse. Por ejemplo, el tampón de baja conductividad tendrá una conductividad de menos de aproximadamente 10 mS/cm, por ejemplo, de aproximadamente 7 mS/cm a aproximadamente 8 mS/cm,

por ejemplo, 7 mS/cm a temperatura ambiente, y puede tener un pH igual a o mayor de aproximadamente 7,0.

En otra realización, la disolución de tampón apropiada es un tampón de enriquecimiento apropiado para el enriquecimiento mediante cromatografía con hidroxiapatita, que pueden seguirse con cromatografía en una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto. Por ejemplo, el tampón de enriquecimiento puede comprender Na/K PO₄ 20 mM y tener un pH de aproximadamente 7 a temperatura ambiente. En otra realización, la disolución de tampón apropiada también comprende iones de calcio y/o zinc, cualquiera o ambos de los cuales estabilizan la proteína ADAMTS13. En una realización, la disolución de tampón apropiada comprende iones de calcio a una concentración de menos de aproximadamente 10 mM, por ejemplo, 2 mM. En otra realización, la disolución de tampón apropiada se complementa con iones de zinc a una concentración de menos de aproximadamente 50 µM, por ejemplo, de 5 µM.

En algunas realizaciones, la disolución de tampón apropiada comprende un agente de tamponamiento que tiene capacidad de tamponamiento en disoluciones con un pH igual a o mayor de aproximadamente 7,0. En una realización, el agente de tamponamiento se selecciona del grupo que consiste en fosfato, tris, HEPES, imidazol, histidina, MES, citrato, Gly-Gly, Tris/acetato, etc.

La muestra obtenida después de esta etapa de UF/DF previa al enriquecimiento puede usarse en etapas de purificación posteriores, por ejemplo, la muestra puede ser un conjunto concentrado por UF/DF que comprende proteínas de la célula huésped que van a eliminarse mediante cromatografía con hidroxiapatita, o cromatografía con hidroxiapatita seguida por cromatografía de modo mixto en una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba. En algunas realizaciones, la muestra tras la etapa de UF/DF previa al enriquecimiento se ha concentrado en de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 20 veces, por ejemplo, en aproximadamente 15 veces, en comparación con la muestra antes de la etapa de UF/DF previa al enriquecimiento.

(b) Cromatografía de intercambio iónico previa al enriquecimiento

Otra etapa opcional previa al enriquecimiento comprende cromatografía previa al enriquecimiento, que puede realizarse antes del enriquecimiento de ADAMTS13 mediante cromatografía con hidroxiapatita o cromatografía en tándem con hidroxiapatita seguida por una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto. Un experto en la técnica reconocerá que la cromatografía previa al enriquecimiento puede realizarse después de la etapa opcional de ultrafiltración/diafiltración previa al enriquecimiento. Alternativamente, la cromatografía previa al enriquecimiento puede realizarse por sí misma, es decir, sin la etapa opcional de ultrafiltración/diafiltración previa al enriquecimiento.

En algunas realizaciones, la etapa de cromatografía previa al enriquecimiento comprende poner en contacto de manera cromatográfica la muestra que comprende ADAMTS13 con una resina de intercambio aniónico y eluir la proteína ADAMTS13 de la resina de intercambio aniónico. Es decir, la ADAMTS13 se une a una resina de intercambio aniónico y posteriormente se eluye de la misma. Tal como se usa en el presente documento, el término "resina de intercambio aniónico" se refiere a cualquier resina adecuada para cromatografía de intercambio aniónico y que tiene una carga neta positiva, por ejemplo, debido a un grupo cargado positivamente (a pH neutro). Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, dietilaminoetano (DEAE), dimetiletanolamina (DMAE), polietilenimina (PEI), aminoetano cuaternario (QAE), trimetilaminoetilo (TMAE), amonio cuaternario (Q), y similares, y combinaciones de los mismos.

En una realización, la resina de intercambio aniónico también tiene una o más de las siguientes características: poros grandes, comportamiento de flujo de perfusión y comportamiento de flujo convectivo. Los ejemplos no limitativos de resinas de intercambio aniónico comercialmente disponibles que pueden usarse en la etapa previa al enriquecimiento divulgada en el presente documento incluyen Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, NJ), ANX-Sepharose Fast Flow low sub (GE Healthcare), DEAE-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare), DEAE-Toyopearl (Tosoh Bioscience LLC, Grove City, OH), QAE-Toyopearl (Tosoh Bioscience LLC), POROS® Q (Applied Biosystems, Foster City, CA), POROS® 50D (Applied Biosystems), POROS® 50PI (Applied Biosystems), medios de interacción convectiva (CIM®; BIA Separation), Fractogel-DMAE (Capitol Scientific Inc., Austin, TX), Fractogel EMD-TMAE (Capital Scientific Inc., Austin, TX), Matrex Cellufine DEAE (Chisso Corp., Rye, NY), y similares.

Durante la cromatografía de intercambio aniónico previa al enriquecimiento, la ADAMTS13 se une a la resina de intercambio aniónico y se aísla de impurezas que no son de ADAMTS13 (por ejemplo, componentes de la célula huésped que pueden estar presentes en el conjunto concentrado de la UF/DF previa al enriquecimiento). En general, la resina de intercambio aniónico absorbe la proteína ADAMTS13, mientras que las impurezas que no son de ADAMTS13 con puntos isoeléctricos mayores que el pH de funcionamiento se eliminan de la corriente del procedimiento fluyendo a través de la columna de intercambio aniónico. Las impurezas que no son de ADAMTS13 con puntos isoeléctricos por debajo del pH de funcionamiento se unen más fuertemente, preferiblemente mucho más fuertemente, a la resina, de manera que preferiblemente no eluyen conjuntamente con la proteína ADAMTS13. A continuación, la columna a la que se adsorbe ADAMTS13 se lava antes de la elución, por ejemplo, para eliminar impurezas o contaminantes holgadamente unidos y/o para ajustar la conductividad del tampón en la preparación para la elución. Normalmente, la ADAMTS13 unida se eluye de la resina de intercambio aniónico aumentando la

fuerza iónica del tampón. En una realización, la ADAMTS13 se eluye mediante elución por etapas. En general, la muestra cargada y el tampón de lavado tienen un pH de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9, por ejemplo, 7,7, y una conductividad de menos de aproximadamente 10 mS/cm (por ejemplo, 6,5 mS/cm) a temperatura ambiente. El/los tampón/tampones de elución pueden tener un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 9 (por ejemplo, 7) y tener una conductividad mayor de aproximadamente 10 mS/cm (por ejemplo, 16,5 mS/cm) a temperatura ambiente.

Normalmente, el eluato de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico proporciona de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 120% de actividad de ADAMTS13 (por ejemplo, proporciona de aproximadamente el 70% o aproximadamente el 80% a aproximadamente el 107% de actividad de ADAMTS) y/o comprende ADAMTS13 recombinante con una pureza de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 70%, (por ejemplo, una pureza de aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, etc). En una realización, la cromatografía de intercambio aniónico reduce las impurezas que no son de ADAMTS13 en de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 5 veces. En una realización preferida, el rendimiento en porcentaje después de la preparación previa al enriquecimiento puede ser de aproximadamente el 75%.

A continuación, la ADAMTS13 eluida puede enriquecerse sometiendo la muestra a cromatografía con hidroxiapatita que permite que una porción sustancial de proteína ADAMTS13 fluya a través o sometiendo la muestra a cromatografía en tándem con hidroxiapatita en condiciones que permitan que una porción sustancial de proteína ADAMTS13 fluya a través, seguida por cromatografía con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto que se une a la proteína ADAMTS13, tal como se describió anteriormente.

Inactivación del virus

Un experto en la técnica reconocerá que los métodos de inactivación del virus pueden ser particularmente útiles en la purificación de ADAMTS13 recombinante de muestras que comprenden o comprenden potencialmente contaminantes virales (impurezas resultantes de y/o derivadas de virus, incluyendo, por ejemplo, partículas de virus, proteína de virus, ADN viral, ARN viral, y fragmentos de los mismos). Por consiguiente, en una realización, el método divulgado en el presente documento comprende además al menos una etapa de inactivación del virus. El término "inactivación del virus" se refiere a cualquiera o ambas de las situaciones en las que los virus se mantienen en la disolución, pero se desactivan o inactivan (por ejemplo, convertidos en no viables, por ejemplo, disolviendo la capa lipídica de los virus con envoltura lipídica); y a la eliminación física de los virus y/o contaminantes virales de la muestra (por ejemplo, mediante exclusión molecular). Por tanto, en el contexto de la divulgación en el presente documento, "inactivación del virus" se refiere a cualquiera o ambas de desactivación viral y eliminación viral.

Si se realiza, la inactivación del virus puede producirse una vez o más de una vez a lo largo del procedimiento de purificación completo. De manera adicional, puede producirse antes o después de someter la muestra a cromatografía con hidroxiapatita. En algunas realizaciones, la inactivación del virus se produce antes y después de la etapa opcional de pulido mediante cromatografía de intercambio catiónico, descrita en más detalle a continuación. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que la inactivación del virus puede producirse opcionalmente, en todo caso, en cualquier etapa durante el procedimiento de purificación. Además, un experto en la técnica puede reconocer el momento apropiado para la inactivación del virus.

Los métodos de conversión del virus con envoltura lipídica en no viable se conocen bien en la técnica. En general, los métodos de desactivación (o inactivación) de virus con envoltura lipídica en una muestra comprenden añadir una mezcla de disolvente-detergente a la muestra (véase, por ejemplo, Edwards, *et al.* (1987) "Tri(n-butyl) phosphate/detergent treatment of licensed therapeutic and experimental blood derivatives" *Vox Sang* 52: 53-59 (véanse especialmente las páginas 54-55); y las patentes estadounidenses n.ºs 4.540.573 (de col. 7, línea 9 a col. 12, línea 42); 4.764.369 (de col. 7, línea 17 a col. 12, línea 47); 4.939.176 (de col. 3, línea 59 a col. 10, línea 14); 5.151.499 (de col. 2, línea 59 a col. 11, línea 38); 6.090.599 (de col. 4, línea 20 a col. 8, línea 67); 6.468.733 (de col. 5, línea 12 a col. 9, línea 36); y 6.881.573 (de col. 5, línea 63 a col. 14, línea 9). La combinación de disolvente-detergente usada para desactivar los virus con envoltura lipídica puede ser cualquier combinación de disolvente-detergente conocida en la técnica y comprende preferiblemente un detergente no iónico y un disolvente orgánico. Los ejemplos no limitativos incluyen fosfato de tri-N-butilo (TnBP) y TRITON X-100™, así como TWEEN 80™ (CAS 9005-65-6), monooleato de polioxietilensorbitano, colato de sodio, y similares. La concentración del/de los disolvente(s) y/o detergente(s) puede ser la usada comúnmente en la técnica, por ejemplo, mayor de aproximadamente el 0,1% de TnBP y mayor de aproximadamente el 0,1% de Triton X-100™.

En algunas realizaciones, las condiciones en las que la mezcla de disolvente-detergente inactiva los virus comprenden de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/ml de disolvente-detergente, a un nivel de pH que oscila desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8, y una temperatura que oscila desde aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 37°C, preferiblemente desde aproximadamente 12°C hasta aproximadamente 25°C, durante de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 24 horas, preferiblemente de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 hora. En algunas realizaciones, la mezcla se sacude o agita ligeramente durante el tratamiento. En una realización, la etapa de inactivación del virus comprende añadir una mezcla de disolvente-detergente (por ejemplo, como mezcla de disolvente-detergente que comprende TnBP al 0,3%, Triton X-100™ al 1%

y TWEEN 80™ al 0,3%) a la muestra durante al menos 1 hora, a de 15°C a 25°C. En otra realización, la muestra se trata con una mezcla de disolvente-detergente que comprende TnBP al 0,3%, Triton X-100™ al 1% y TWEEN 80™ al 0,3% durante 30 minutos a de 12°C a 16°C. Pueden usarse otras combinaciones de disolvente-detergente y/o condiciones adecuadas, tal como resultarán evidentes para un experto en la técnica, tales como combinaciones de polisorbato o colato y fosfato de tri-n-butilo. Tales combinaciones pueden requerir tiempos de tratamiento más largos, por ejemplo, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, o más.

La inactivación puede lograrse mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la inactivación puede detenerse mediante dilución, preferiblemente mediante dilución con tampón de dilución frío. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la inactivación se detiene mediante dilución con un volumen de tampón de dilución frío que comprende aproximadamente MES 20 mM, y que tiene un pH de aproximadamente 6 a temperatura ambiente.

Después de la desactivación de los virus con envoltura lipídica con la combinación de disolvente-detergente, la mezcla de disolvente-detergente puede eliminarse. Por ejemplo, la mezcla de disolvente-detergente puede eliminarse mediante cromatografía u otros medios adecuados. En algunas realizaciones, se usa cromatografía con una resina de eliminación de disolvente-detergente (SDR), tal como, por ejemplo, resina HyperD™ (Biosepra Inc., MA) (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.468.733 (de col. 5, línea 12 a col. 9, línea 36)).

Inactivación de contaminantes virales con proteína inmovilizada

En algunas realizaciones, la inactivación del virus comprende la desactivación viral con disolvente-detergente mientras que la proteína se inmoviliza. Un procedimiento de este tipo puede usarse en la inactivación del virus del polipéptido ADAMTS13 descrito en el presente documento, así como para otras proteínas. Otras proteínas pueden incluir, sin limitación, cualquier proteína o producto biológico de una fuente que puede tener contaminantes virales, incluyendo proteínas del sistema inmunitario (anticuerpos, anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión, fusiones Fc, antígenos principales de histocompatibilidad, receptor de células T), enzimas (oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas, ligasas), proteínas estructurales, proteínas fibrosas (tales como proteínas citoesqueléticas, como actina, Arp2/3, coronina, distrofina, queratina, miosina, espectrina, proteína Tau, tubulina y proteínas de la matriz extracelular, como colágeno, elastina, F-espondina), proteínas globulares, proteínas plasmáticas (albúmina sérica y componente amiloide sérico P), factores de coagulación (como proteínas del complemento, factor VIII, factor XIII, fibrina, proteína C, proteína S, proteína Z, inhibidor de proteasa relacionado con la proteína Z, trombina, factor de von Willebrand), proteína C reactiva, hemoproteínas, proteínas de adhesión celular (cadherina, ependimina, integrina, NCAM, selectina), proteínas de transporte transmembrana (CFTR, glicoforina D, escramblasa), canales iónicos (canal de potasio del receptor de acetilcolina), proteínas de cotransporte unidireccional/bidireccional (transportador de glucosa), hormonas y factores de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina, oxitocina), receptores (receptores transmembrana, receptor acoplado a la proteína G, rodopsina, receptores intracelulares como el receptor de estrógenos), proteínas de unión de ADN (histonas), proteínas de regulación de la transcripción (c-myc, FOXP2, FOXP3, MyoD, p53), proteínas de almacenamiento/transporte de nutrientes (ferritina), proteínas chaperonas, complejos macromoleculares (nucleosoma, ribonucleoproteína, partícula de reconocimiento de señales, espliceosoma), y similares. En realizaciones preferidas, la proteína es proteína recombinante, particularmente proteínas sensibles a la agregación cuando se exponen a disolvente orgánicos y detergentes. En algunas realizaciones, la proteína es proteína ADAMTS13, en particular ADAMTS13 recombinante, o una proteína diferente (en particular, una proteína recombinante diferente). En algunas realizaciones, la proteína recombinante es un factor de coagulación sanguínea. En algunas realizaciones, la proteína es, por ejemplo, uno o más de factor VIII, factor II, trombina, factor VIIa, factor IX, factor de von Willebrand, anticuerpos anti-MIF y en particular proteínas susceptibles a purificación cromatográfica y/o proteínas sensibles al tratamiento con disolvente-detergente. Por consiguiente, otro aspecto de la presente descripción se refiere a la inactivación del virus de una proteína inmovilizada. Preferiblemente, la inactivación del virus se lleva a cabo junto con un procedimiento de purificación de proteínas, de manera que el procedimiento implica la inactivación del virus de una preparación de proteínas inmovilizando la proteína que va a purificarse.

La etapa de inactivación del virus con disolvente-detergente convencional aplicada en procedimientos aguas abajo para purificar diversas proteínas, tales como las descritas anteriormente, generalmente implica añadir la mezcla de disolvente-detergente en disolución a la muestra que va a purificarse, por ejemplo, en un procedimiento discontinuo. En el procedimiento discontinuo, una muestra que comprende la proteína se trata con la mezcla de disolvente-detergente (por ejemplo, una mezcla que comprende aproximadamente Triton X-100 al 1%, aproximadamente fosfato de tri-N-butilo al 0,3% y aproximadamente polisorbato 80 al 0,3%) en un recipiente agitado (por ejemplo, un tanque para purificaciones a gran escala). Después de la disolución de los productos químicos del disolvente-detergente, la disolución de muestra tratada puede bombearse a un segundo recipiente agitado, en el que, por definición, tiene lugar la inactivación del virus real, ya que aquí se incuba la disolución de proteína para permitir que tenga lugar tal desactivación (por ejemplo, durante de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente una hora).

Por el contrario, algunas realizaciones de la descripción inmediata implican la inactivación del virus de una composición que comprende una proteína, por ejemplo, una proteína que va a purificarse, en la que la proteína se inmoviliza. El procedimiento comprende poner en contacto la composición que comprende la proteína de interés con una mezcla disolvente-detergente mientras que la proteína se inmoviliza, en lugar de que la proteína objetivo esté en

disolución. En realizaciones preferidas, la proteína se inmoviliza en una resina cromatográfica. La inactivación del virus en la que la proteína se inmoviliza en una resina cromatográfica, por ejemplo, en una columna cromatográfica, se denomina en el presente documento inactivación del virus "en columna". La purificación de ADAMTS13 en Poros S, descrita en los ejemplos a continuación, proporciona una realización de este procedimiento, en la que la inactivación del virus se lleva a cabo en columna. Un experto en la técnica reconocerá que la proteína puede inmovilizarse sobre diversos soportes, mediante una variedad de medios. Por ejemplo, la proteína puede unirse a cualquier soporte sólido o semisólido, incluyendo un portaobjetos de vidrio, perlas, matriz o membranas. La inmovilización puede resultar de cualquier procedimiento mediante el cual la proteína se fija al soporte en relación con otros componentes de la disolución de proteína. La inmovilización puede producirse debido a uno o más tipos de enlaces entre los grupos en el soporte y los grupos en la proteína, tales como, por ejemplo, mediante ligación covalente, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals, y similares, o combinaciones de los mismos.

La inactivación del virus de proteína inmovilizada en una columna cromatográfica puede simplificar la purificación. Por ejemplo, en lugar de requerir más de un recipiente (tal como un sistema de dos tanques usado en purificaciones a gran escala), la purificación cromatográfica y la inactivación del virus pueden llevarse a cabo en el mismo recipiente, por ejemplo, en la misma columna cromatográfica. Esto simplifica los procedimientos aguas abajo de la purificación de proteínas, por ejemplo, reduciendo el tiempo, conservando los reactivos y/o aumentando la eficacia. En algunas realizaciones, la columna cromatográfica es una resina de intercambio catiónico. En algunas realizaciones, la columna cromatográfica es una resina de intercambio aniónico.

Un beneficio adicional y sorprendente de determinadas realizaciones de la inactivación del virus de proteína inmovilizada es la reducción en la formación de agregados. Algunas proteínas muestran sensibilidad hacia las mezclas de disolvente-detergente, por ejemplo, formando agregados cuando se ponen en contacto con los reactivos del disolvente-detergente en disolución. Sin limitarse a ninguna teoría o hipótesis particular, poniendo en contacto la proteína sensible con la mezcla de disolvente-detergente mientras se inmoviliza, por ejemplo, mientras la proteína se une a una resina cromatográfica, puede evitarse la formación de agregados basándose simplemente en la incapacidad física de las moléculas de proteína inmovilizadas de ponerse en contacto entre sí. En algunas realizaciones, la inactivación da como resultado la formación de menos de aproximadamente el 20% de agregados, menos de aproximadamente el 18%, menos de aproximadamente el 15%, menos de aproximadamente el 12%, menos de aproximadamente el 10%, o menos de aproximadamente el 5% de agregados. Y, en determinadas realizaciones, el nivel de agregación se reduce en al menos aproximadamente el 10%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 50% o aproximadamente el 100%, en comparación con el nivel de agregación cuando la preparación de proteína se somete a inactivación del virus en la que la proteína no está inmovilizada.

En una realización preferida, la proteína se carga en una resina cromatográfica y el tratamiento con disolvente-detergente se usa como una etapa de lavado, preferiblemente una etapa de lavado que continúa durante un periodo de incubación lo suficientemente largo como para permitir la inactivación de virus con envoltura lipídica. Por ejemplo, la etapa de lavado preferiblemente continúa durante de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente una hora. La mezcla de disolvente-detergente comprenderá detergente no iónico y disolvente orgánico a concentraciones adecuadas para efectuar tal inactivación del virus, tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la mezcla disolvente-detergente comprende Triton X-100 al 1%, fosfato de tri-N-butilo al 0,3% y polisorbato 80 al 0,3%. Detalles adicionales para algunas realizaciones particulares se proporcionan a continuación, con respecto a la purificación de ADAMTS13.

La inactivación del virus también puede comprender la eliminación viral, por ejemplo, mediante filtración, tal como nanofiltración usando un nanofiltro. Tal eliminación viral puede producirse sola, o en combinación con desactivación viral (inactivación), por ejemplo, la etapa de desactivación viral que comprende el tratamiento con una mezcla de disolvente-detergente tal como se describió anteriormente. Cuando la inactivación del virus comprende tanto desactivación viral como eliminación viral, la eliminación viral puede producirse antes de y/o posterior a la desactivación viral mediante el tratamiento con disolvente-detergente. En general, la eliminación viral de una muestra implica filtrar la muestra, por ejemplo, pasando la muestra a través de un filtro que tiene un tamaño de poro que mantiene la ADAMTS13 en la muestra, mientras se permite que los virus y los contaminantes virales fluyan a través. En una realización, el tamaño de poro del filtro es de entre aproximadamente 15 nm y aproximadamente 50 nm. La filtración también puede llevarse a cabo mediante nanofiltración usando un filtro de 20 N o 35 N (Planova, Asahi Kasei). En algunas realizaciones, se usan filtros previos para evitar la obstrucción del nanofiltro, por ejemplo, puede usarse un filtro de aproximadamente 2 µm, o una membrana de PVDF o PES de 0,2 µm.

Pulido mediante cromatografía de intercambio catiónico

En algunas realizaciones, el método comprende, además, después de la cromatografía con hidroxipatita (o cromatografía en tándem con hidroxipatita seguida por una resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica de modo mixto), la etapa opcional de pulido de la muestra que comprende ADAMTS13 mediante cromatografía en una resina de intercambio catiónico. En esta etapa, la conductividad del tampón que comprende ADAMTS13 puede reducirse antes del pulido, si fuese necesario, para lograr una conductividad apropiada para la cromatografía de intercambio catiónico.

(a) Reducción de la conductividad del tampón

Después de la cromatografía con hidroxipatita o cromatografía en tándem con hidroxipatita seguida por una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto, el tampón que comprende proteína ADAMTS13 puede prepararse para el intercambio catiónico reduciendo la conductividad del tampón, por ejemplo, eliminando los componentes iónicos (por ejemplo, cloruro de sodio). En algunas realizaciones, la conductividad del tampón se reduce hasta menos de aproximadamente 5 mS/cm y/o el pH se reduce hasta aproximadamente 6,0. La conductividad del tampón puede reducirse mediante cualquier método conocido en la técnica, descrito en el presente documento, o tal como puede apreciar un experto en la técnica, especialmente a la luz de las divulgaciones en el presente documento. Los ejemplos no limitativos incluyen ultrafiltración/diafiltración (por ejemplo, con casetes de flujo cruzado o módulos de fibras huecas), filtración en gel, diálisis, etc.

En una realización, la proteína ADAMTS13 se prepara para el intercambio catiónico mediante ultrafiltración/diafiltración con una membrana que tiene un valor de corte de aproximadamente 10 kDa, frente a un tampón de equilibrio de intercambio catiónico (por ejemplo, un tampón que comprende MES 20 mM, pH 6,0 a temperatura ambiente). En algunas realizaciones, la membrana de ultrafiltración/diafiltración es una membrana de PES, que tiene un valor de corte de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 50 kDa, por ejemplo, un valor de corte de aproximadamente 20 kDa, un valor de corte de aproximadamente 30 kDa, un valor de corte de aproximadamente 40 kDa, etc. Usando un enfoque de este tipo, el pH del tampón puede reducirse desde aproximadamente 8,0 hasta aproximadamente 6,0; y/o la conductividad del tampón puede reducirse hasta por debajo de aproximadamente 2 mS/cm a temperatura ambiente. En algunas de tales realizaciones, el tampón para la diafiltración puede comprender MES 20 mM y puede tener un pH de 6,0 a temperatura ambiente y/o una conductividad de 0,6 mS/cm a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, la conductividad del tampón para la diafiltración puede ser idéntico, o sustancialmente idéntico, al tampón de equilibrio de intercambio catiónico que va a usarse.

En una realización, la preparación del tampón que comprende ADAMTS13 para el intercambio catiónico se realiza mediante diálisis, por ejemplo, usando un hardware Dialyzer que comprende módulos de hemodiálisis, tales como un módulo de hemodiálisis de fibras huecas (serie Aquamax, PES chemistry of the Hollowfibers, Edwards Lifesciences, Unterschleißheim, Alemania). En general, se usan aproximadamente 2 m² de área de filtro para aproximadamente 5 l de muestra; y el tampón de muestra y el tampón de diálisis se hacen circular en flujo inverso el uno con el otro. En algunas realizaciones, la diálisis consiste en no más de dos pases a través de un único módulo de diálisis. Por "único módulo de diálisis" quiere decirse una unidad o estructura a través de la que se realiza la diálisis. Un módulo de diálisis generalmente comprende un haz de extremos abiertos de membranas de fibras huecas encapsulado en una carcasa tubular para crear dos cámaras de flujo distintas, luminal y extracapilar, cada una con un acceso de puerto de entrada y de salida. Una membrana de fibras huecas semipermeable separa las dos cámaras y permite de manera selectiva el paso basándose en el tamaño y el gradiente de concentración de los solutos mientras se restringe el paso de otros solutos entre las 2 cámaras. Haciendo funcionar el módulo en un modo de flujo a contracorriente, los solutos que pasan a través de la membrana se barren rápidamente y se diluyen en un gran volumen de disolución de dializado ("barrido"), manteniendo el gradiente de concentración más grande posible. Por consiguiente, la diálisis puede realizarse en un barrido de un único paso a través de un único módulo de diálisis.

En algunas realizaciones, se usa una combinación de estos enfoques, por ejemplo, puede usarse UF/DF con diálisis para efectuar la concentración de la muestra y el intercambio de tampón en la preparación para el pulido mediante cromatografía de intercambio catiónico. En todavía otras realizaciones, el intercambio de tampón puede llevarse a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico.

(b) Cromatografía de intercambio catiónico

Tal como se indicó anteriormente, el método divulgado en el presente documento puede comprender opcionalmente el pulido de la muestra mediante cromatografía en una resina de intercambio catiónico. Tal como se usa en el presente documento, el término "resina de intercambio catiónico" se refiere a cualquier resina adecuada para cromatografía de intercambio catiónico y que tiene una carga neta negativa, por ejemplo, debido a un grupo cargado negativamente (a pH neutro). Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, un grupo carboxilo, un grupo carboximetilo (CM), un grupo sulfoalquilo (SP, SE), un grupo metilsulfonato (S), un éster sulfatado de celulosa, heparina, y similares, y combinaciones de los mismos. Esta etapa generalmente se diseña para concentrar el producto de ADAMTS13, poner el producto en un tampón de formulación previa y reducir además las impurezas que no son de ADAMTS13, incluyendo las impurezas relacionadas con el procedimiento (por ejemplo, proteínas de la célula huésped, tales como proteínas CHO, ADN de la célula huésped, tales como ADN de CHO, reactivos de la mezcla disolvente-detergente, etc), así como impurezas relacionadas con el producto (por ejemplo, agregados y fragmentos biológicamente no activos de ADAMTS13).

En una realización, la resina de intercambio catiónico también tiene una o más de las siguientes características: poros grandes, comportamiento de flujo de perfusión y comportamiento de flujo convectivo. Los ejemplos no

limitativos de resinas de intercambio catiónico comercialmente disponibles que pueden usarse en la etapa de pulido divulgada en el presente documento incluyen POROS® S (Applied Biosystems), medios de interacción convectiva (CIM®; BIA Separation), Toyopearl Gigacap S (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA), Toyopearl Gigacap CM (Tosoh), Toyopearl SP (Tosoh), Toyopearl CM (Tosoh), MacroPrep S (Bio-rad, Hercules, CA), UNOsphereS (Bio-rad, Hercules, CA), MacroprepCM ((Bio-rad, Hercules, CA), Fractogel EMD SO3 (Merck), Fractogel EMD COO (Merck), Fractogel EMD SE Hicap (Merck), sulfato de celulosa (Chisso), CM y SP Trisacryl (Pall), CM y S HyperD (Pall), Mustang S (Pall), S y CM Sepharose CL (GE Healthcare), S y CM Sepharose FF (GE Healthcare), S y CM CAPTO™ (GE Healthcare), MonoS (GE Healthcare), Source S (GE Healthcare), y similares.

La cromatografía en una resina de intercambio catiónico es un método bien conocido en la técnica. En algunas realizaciones, la columna de intercambio catiónico tiene una carga máxima de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5 mg de ADAMTS13/ml. En una realización preferida, la columna se carga con al menos 0,3 mg de ADAMTS13/ml. En general, durante la cromatografía en una resina de intercambio catiónico, la ADAMTS13 se une a la resina de intercambio catiónico, y se permite que el tampón y determinadas impurezas fluyan a través. A continuación, puede lavarse la columna a la que se adsorbe ADAMTS13, por ejemplo, para eliminar los contaminantes o las impurezas holgadamente unidos y/o para ajustar el tampón en preparación para la elución de ADAMTS13 de la resina de intercambio catiónico. Después puede eluirse la ADAMTS13 en el eluato.

En algunas realizaciones, el eluato obtenido de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico contiene una cantidad mayor de agregados de ADAMTS13 que la deseada. En algunas realizaciones, por ejemplo, el eluato comprende más de aproximadamente el 15% de agregados, que se cree que se introducen después de la concentración y el intercambio de tampón con la etapa de dializador, y/o la etapa de cromatografía de intercambio catiónico.

Para permitir la producción de ADAMTS13 con un porcentaje significativamente menor de agregados, pueden usarse determinadas condiciones con la resina de intercambio catiónico, tal como se detalla adicionalmente en la figura 2 con respecto a la resina de intercambio catiónico Poros S. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se usa una combinación que comprende la purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico seguida por la inactivación del virus con disolvente-detergente en columna, por ejemplo tal como se describió con más detalle anteriormente. Esta combinación preferiblemente da como resultado menores cantidades de agregados que aparecen con el polipéptido de ADAMTS13 en el eluato. En realizaciones más preferidas, el procedimiento de elución comprende una elución en gradiente (en lugar de una elución por etapas), que puede eliminar adicionalmente los agregados de ADAMTS13, por ejemplo, en la parte descendente del pico de elución. En realizaciones incluso más preferidas, la concentración de Tween 80 en el tampón de elución es mayor de aproximadamente el 0,05%, por ejemplo aproximadamente el 0,06%, aproximadamente el 0,07%, aproximadamente el 0,08%, aproximadamente el 0,09%, preferiblemente aproximadamente el 0,1%, aproximadamente el 0,11%, aproximadamente el 0,12%, aproximadamente el 0,13%, aproximadamente el 0,14%, o aproximadamente el 0,15%. Se cree que la concentración aumentada tiene un efecto estabilizante adicional sobre ADAMTS13, evitando adicionalmente la formación de estructuras de alto peso molecular durante la elución de ADAMTS13 de la resina. Por "estabilizar la proteína ADAMTS13" o "efecto estabilizante sobre ADAMTS13" quiere decirse que se tiende a promover la estructura nativa de ADAMTS13, particularmente, en una forma intacta y/o monomérica, o una forma sustancialmente intacta y/o monomérica, en lugar de una forma fragmentada o agregada. Estabilizar también puede referirse a la tendencia de la ADAMTS13 obtenida a resistir la fragmentación, la pérdida de estructura nativa y/o la agregación frente a condiciones desestabilizantes de otra manera, tales como temperaturas variables, pH variable, fuerzas iónicas, y similares.

La proteína ADAMTS13 también puede estabilizarse mediante una matriz usada durante la recolección, por ejemplo, en la que la inactivación del virus mediante tratamiento con disolvente-detergente se realiza en una recolección concentrada. Además, los agregados que se forman pueden eliminarse mediante las últimas etapas de purificación, tales como captura en una columna de cromatografía de intercambio aniónico (tal como ANX Sepharose, tal como se describe en el presente documento); y/o el pulido mediante cromatografía (tal como cromatografía en tándem con hidroxipatita/Capto MMC, tal como se describe en el presente documento).

Usar una o más modificaciones descritas anteriormente puede dar como resultado un eluato que comprende menores cantidades de agregados de polipéptido de ADAMTS13. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, el eluato de la columna de intercambio catiónico puede comprender menos de aproximadamente el 20%, menos de aproximadamente el 18%, menos de aproximadamente el 15%, menos de aproximadamente el 12%, menos de aproximadamente el 10%, o menos de aproximadamente el 5% de agregados.

Una etapa final de cromatografía en una resina de intercambio catiónico comprende eluir la proteína ADAMTS13 con un tampón de elución. En algunas realizaciones, la ADAMTS13 unida se eluye de la resina de intercambio catiónico aumentando la fuerza iónica del tampón. El tampón que comprende ADAMTS13 usado para poner en contacto de manera cromatográfica la resina de intercambio catiónico generalmente tiene una conductividad de menos de aproximadamente 10 mS/cm a temperatura ambiente, por ejemplo, menos de 5 mS/cm. Además, el tampón que comprende ADAMTS13 usado para poner en contacto de manera cromatográfica la resina de intercambio catiónico generalmente tiene un pH de menos de aproximadamente 7,0 a temperatura ambiente, por ejemplo, 6,0. El tampón

de elución usado para eluir la proteína ADAMTS13 de la resina de intercambio catiónico puede tener una fuerza iónica por debajo de tales tampones. La resina también puede lavarse con un tampón que tiene un pH igual a, o sustancialmente igual a, el pH del tampón de almacenamiento previsto.

En una realización preferida, la proteína ADAMTS13 se eluye de la resina de intercambio catiónico con un tampón de almacenamiento. En general, por tampón de almacenamiento quiere decirse un tampón que tiene un pH entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9 a temperatura ambiente, y que comprende calcio, un compuesto de tamponamiento y una sal. El pH del tampón de almacenamiento puede ser mayor de aproximadamente 7,0 (por ejemplo, aproximadamente 7,5) a temperatura ambiente. El tampón de almacenamiento puede comprender menos de aproximadamente Ca^{++} 10 mM (por ejemplo, Ca^{++} 2 mM); el compuesto de tamponamiento puede seleccionarse del grupo que consiste en fosfato, Tris, HEPES, histidina, imidazol, Gly-Gly, MES, tricina, acetato, y similares; y la sal puede seleccionarse del grupo que consiste en NaCl, KCl, CaCl_2 , MgCl_2 , y similares. En una realización preferida, el tampón de almacenamiento tiene un pH mayor de 7,0 y comprende menos de 10 mM de iones de calcio, un compuesto de tamponamiento y una sal. En una realización más preferida, el tampón de almacenamiento comprende además un detergente no iónico, por ejemplo, de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 0,5% de detergente no iónico, por ejemplo detergente no iónico al 0,05%. En realizaciones incluso más preferidas, el eluato no se somete a etapas de concentración posterior ni de intercambio de tampón tras la elución de la resina de intercambio catiónico con el tampón de almacenamiento.

En una realización particular, se usa Source S (GE Healthcare) como resina de intercambio catiónico de la etapa de pulido, por ejemplo, una columna Source S con una altura de lecho de aproximadamente 20 cm. En tales realizaciones, la columna puede activarse con aproximadamente 2 volúmenes de columna de aproximadamente NaCl 2 M y equilibrarse con aproximadamente 6 volúmenes de columna de un tampón que comprende aproximadamente MES 20 mM, aproximadamente NaCl 10 mM y aproximadamente CaCl_2 2 mM, que tiene un pH de aproximadamente 6 a temperatura ambiente. El tampón que comprende ADAMTS13 puede ponerse en contacto con la columna a una conductividad por debajo de aproximadamente 5 mS/cm a temperatura ambiente, y lavarse posteriormente la columna con el tampón de equilibrio, y finalmente recogerse el eluato que comprende proteína ADAMTS13. Después de la recogida, puede concentrarse el eluato e intercambiarse el tampón por tampón de almacenamiento, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio aniónico, diafiltración, ultrafiltración, diálisis, y similares.

En otra realización particular, se usa POROS® S como resina de intercambio catiónico en el pulido de la muestra que comprende proteína ADAMTS13. En esta realización, el tampón que comprende ADAMTS13 usado para poner en contacto de manera cromatográfica la resina de intercambio catiónico puede tener una conductividad de menos de aproximadamente 5 mS/cm y un pH entre aproximadamente 6,1 y aproximadamente 6,4. Puede eluirse la ADAMTS13 usando elución en gradiente, aunque la elución por etapas puede proporcionar preferiblemente un producto más concentrado. Si se realiza elución en gradiente, pueden usarse dos tampones, por ejemplo, un primer tampón que tiene un bajo contenido de sales (por ejemplo, de poca a ninguna sal) y un segundo tampón que tiene un mayor contenido de sales (por ejemplo, aproximadamente 500 mM) de manera que el conjunto de eluato puede tener una concentración de sales de aproximadamente 200 mM. Si se realiza elución por etapas, el tampón de elución puede comprender un tampón de almacenamiento, por ejemplo, un tampón de almacenamiento que tiene aproximadamente NaCl 300 mM, aproximadamente CaCl_2 2 mM, aproximadamente histidina 20 mM, aproximadamente Tween 80 al 0,05%, y puede tener un pH de aproximadamente 7,5 a temperatura ambiente. En algunas de tales realizaciones, no es necesario un intercambio de tampón después de la etapa con POROS® S, es decir, las fracciones de ADAMTS13 obtenidas de POROS® S ya están en un tampón y a una concentración adecuada para el almacenamiento. En todavía otras realizaciones, las fracciones de ADAMTS13 obtenidas de la columna POROS® S pueden someterse a etapas adicionales de concentración y/o intercambio de tampón.

En general, la purificación de proteína ADAMTS13 recombinante según algunas realizaciones de los métodos divulgados en el presente documento proporciona composiciones de proteína ADAMTS13 pura. En una realización, la purificación de proteína recombinante según el método divulgado proporciona proteína ADAMTS13 que es al menos aproximadamente el 90% pura, por ejemplo, al menos aproximadamente el 95% pura, por ejemplo, al menos aproximadamente el 98% pura, por ejemplo, o al menos aproximadamente el 99% pura. Pueden obtenerse rendimientos de al menos aproximadamente el 20% según algunas realizaciones del método divulgado. En una realización, el método proporciona rendimientos de al menos aproximadamente el 5%, por ejemplo, aproximadamente el 30%, por ejemplo, aproximadamente el 10%, por ejemplo, aproximadamente el 20%, por ejemplo, aproximadamente el 40%, por ejemplo, aproximadamente el 50%, por ejemplo, aproximadamente el 60%, por ejemplo, aproximadamente el 70%, por ejemplo, aproximadamente el 80%, por ejemplo, aproximadamente el 90%, o por ejemplo, aproximadamente el 95%. En algunas realizaciones, el método proporciona proteína ADAMTS13 que tiene una actividad específica que oscila desde aproximadamente 500 unidades/mg de ADAMTS13 hasta aproximadamente 1.000 unidades/mg de ADAMTS13. En otra realización, el método proporciona proteína ADAMTS13 UV 280 hasta aproximadamente 2.400 unidades/mg de proteína ADAMTS13 UV 280. En otra realización, en la que la proteína ADAMTS13 recombinante se produce mediante células CHO transformadas con ácido nucleico de ADAMTS13 recombinante, la purificación de ADAMTS13 recombinante según el método divulgado produce una composición que tiene menos de aproximadamente 1.000 ppm de impurezas de la célula huésped. En

algunas realizaciones, el método proporciona al menos aproximadamente 2 mg/ml de proteína ADAMTS13 en un tampón de almacenamiento.

Composiciones que comprenden proteína ADAMTS13 recombinante

La presente descripción proporciona además composiciones que comprenden ADAMTS13 recombinante purificada según un método divulgado en el presente documento. Las composiciones divulgadas en el presente documento pueden ser útiles para el almacenamiento de ADAMTS13 recombinante purificada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína ADAMTS13 purificada se almacena congelada, por ejemplo, a menos de aproximadamente -60°C. Las composiciones divulgadas en el presente documento también pueden ser útiles para la administración terapéutica de la proteína ADAMTS13 y/o para preparar composiciones para administración terapéutica, en particular, administración parenteral. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la ADAMTS13 purificada obtenida según los métodos descritos en el presente documento está en forma de un principio activo a granel, es decir, en una forma lista para su formulación en composiciones para administración terapéutica.

Por consiguiente, otro aspecto de la descripción se refiere a composiciones farmacéuticas en las que la proteína ADAMTS13 recombinante purificada se mezcla con excipiente(s) u otros portadores farmacéuticamente aceptables. En realizaciones preferidas, el portador farmacéuticamente aceptable es farmacéuticamente inerte. Un portador farmacéuticamente inerte es uno que no reacciona, o no reacciona sustancialmente, con el principio activo, y/o en particular, no afecta, o no afecta sustancialmente, a las propiedades farmacéuticas deseadas del principio activo. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse de cualquier manera conocida en la técnica, por ejemplo, mediante mezclado convencional, disolución, granulación, elaboración de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento, liofilización, y similares.

Dependiendo del estado que va a tratarse, estas composiciones farmacéuticas pueden formularse y administrarse de manera sistémica o local. Las técnicas para la formulación y la administración pueden encontrarse en la edición más reciente de "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Co, Easton Pa.). Las vías adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral o transmucosa; así como administración parenteral, incluyendo administración intramuscular, administración subcutánea, administración intramedular, administración intratecal, administración intraventricular, administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración intranasal, y similares.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente descripción incluyen composiciones que comprenden ADAMTS13 como principio activo en una cantidad eficaz para lograr un propósito previsto. Una "cantidad eficaz" de ADAMTS13, tal como se usa en el presente documento, puede referirse a la cantidad que incrementa, potencia, mejora, aumenta o produce un efecto biológico de ADAMTS13 nativa. Los efectos biológicos de ADAMTS13 nativa incluyen actividad de proteasa de escisión de vWF, basada en la acción de ADAMTS13 en la escisión del factor von Willebrand, una proteína grande implicada en la coagulación sanguínea. Una "cantidad eficaz" incluirá una cantidad de ADAMTS13 que da como resultado niveles disminuidos de agregación de plaquetas, por ejemplo, reducción de los niveles en un individuo que padece un trastorno de coagulación sanguínea hasta niveles más comparables a los de un individuo que no padece el trastorno de coagulación sanguínea. Los trastornos de coagulación sanguínea incluyen, pero no se limitan a, púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) también conocida como síndrome de Moschcowitz, síndrome de Upshaw-Schulman (forma familiar de TTP) y accidente cerebrovascular. Una "cantidad eficaz" también incluye la cantidad para lograr un beneficio profiláctico y/o terapéutico en el tratamiento de uno o más trastornos de coagulación sanguínea y estados asociados. La determinación de determinadas cantidades eficaces está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

La presente descripción proporciona métodos, composiciones farmacéuticas y kits para tratar y/o prevenir trastornos de coagulación sanguínea y estados asociados en sujetos animales. El término "sujeto animal", tal como se usa en el presente documento, incluye humanos así como otros mamíferos.

El término "tratar y/o prevenir", tal como se usa en el presente documento, incluye lograr un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico, respectivamente. Por beneficio terapéutico quiere decirse la reversión o mejora del trastorno de coagulación sanguínea subyacente que va a tratarse. Por ejemplo, en un paciente con TTP, el beneficio terapéutico incluye erradicar o mejorar uno o más de los estados y/o síntomas asociados con TTP, de manera que se observa una mejora en el paciente, a pesar del hecho de que el paciente todavía puede verse afectado por el trastorno subyacente. Por ejemplo, el tratamiento puede proporcionar un beneficio terapéutico no sólo cuando se reduce o erradica la formación de trombosis, sino también cuando se observa una mejora en el paciente con respecto a los síntomas que acompañan a TTP, tales como cefaleas reducidas, fiebre disminuida y/o insuficiencia renal retrasada.

Para el beneficio profiláctico, una composición farmacéutica de la presente descripción puede administrarse a un paciente en riesgo de desarrollar un trastorno de coagulación sanguínea, incluyendo, por ejemplo, un paciente que notifica uno o más de los síntomas o estados asociados comúnmente con trastornos de coagulación sanguínea como TTP, incluso aunque todavía no se haya realizado un diagnóstico.

Además del principio activo, las composiciones farmacéuticas pueden comprender portadores farmacéuticamente aceptables adecuados tales como excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en las preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente.

5 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral generalmente comprenden disoluciones acuosas del principio activo en una forma soluble en agua. En algunas realizaciones, las suspensiones del principio activo pueden prepararse como suspensiones oleosas para inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que
10 aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad del principio activo, por ejemplo, para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

15 Para inyección, las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden formularse en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hanks, disolución de Ringer o solución salina fisiológicamente tamponada. Para administración tisular o celular, se usan agentes de penetración apropiados para la barrera particular que va a permearse en la formulación. Tales agentes de penetración son generalmente conocidos en la técnica.

20 Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse combinando el principio activo con un excipiente sólido, opcionalmente moliendo una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados incluyen cargas de hidratos de carbono o proteínas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón del maíz, el trigo, el arroz, la patata, etc; celulosa tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa
25 o carboximetilcelulosa de sodio; gomas incluyendo arábica y tragacanto; y proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes o solubilizantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido alginico, o una sal del mismo tal como alginato de sodio. También pueden usarse portadores que permiten que se formulen las composiciones farmacéuticas como comprimidos, pastillas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, dispersiones, disoluciones, suspensiones, grageas, y similares, para ingestión oral y/o nasal por un paciente
30 que va a tratarse.

Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas de ajuste a presión elaboradas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas elaboradas de gelatina y un recubrimiento tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener el principio activo mezclado con cargas o aglutinantes,
35 tales como lactosa o almidones; lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites, parafina líquida o polietilenglicol líquido, con o sin estabilizadores.

40 Las composiciones que comprenden ADAMTS13 u otra proteína preparadas según un método descrito en el presente documento pueden formularse con un portador farmacéuticamente aceptable, colocarse en un envase adecuado (o kit) y marcarse para el tratamiento de un estado indicado.

Ejemplos

45 Los siguientes ejemplos se proporcionan con propósitos ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

50 La figura 1 proporciona un método a modo de ejemplo para purificar proteína ADAMTS13, según determinadas realizaciones de la invención tal como se divulga en el presente documento. En el ejemplo proporcionado, se purifica proteína ADAMTS13 recombinante del sobrenadante recogido del cultivo de células CHO que comprende una secuencia de nucleótidos de ADAMTS13 recombinante. En este ejemplo, la muestra es sobrenadante de cultivo celular que comprende aproximadamente 2 unidades/ml (aproximadamente 2 µg/ml) de proteína ADAMTS13.

55 Tal como se muestra en la figura 1, una muestra que comprende ADAMTS13 e impurezas que no son de ADAMTS13 puede someterse en primer lugar a una preparación opcional previa al enriquecimiento: (a) tal como se muestra en la etapa 101, la muestra puede concentrarse mediante ultrafiltración (de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 20 veces) y el tampón intercambiarse mediante diafiltración (valor de corte de peso molecular de aproximadamente 30 kDa); y (b) tal como se muestra en la etapa 102, la proteína ADAMTS13 puede unirse a y
60 eluirse de una resina de intercambio aniónico, antes del enriquecimiento adicional.

Preparación previa al enriquecimiento de la muestra

(a) Ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) previa al enriquecimiento

65 Tal como se muestra en la figura 1, etapa 101, para optimizar la carga para la cromatografía de intercambio aniónico

previa al enriquecimiento, el sobrenadante de cultivo celular se concentra en de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 20 veces y se diafiltra usando una membrana PES (valor de corte de aproximadamente 30 kDa a aproximadamente 50 kDa; Pall Omega) para un tampón de baja conductividad que contiene iones de calcio y zinc, que se considera que estabilizan la ADAMTS13. El tampón para la diafiltración del sobrenadante de cultivo celular es Tris 20 mM, polisorbato 80 al 0,1%, NaCl 85 mM, CaCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 5 mM, con un pH de 7,7 a temperatura ambiente.

(b) Cromatografía de intercambio iónico previa al enriquecimiento

Tal como se muestra en la figura 1, etapa 102, la cromatografía de intercambio aniónico previa al enriquecimiento puede realizarse usando ANX Sepharose Fast Flow low sub de GE Healthcare. Esta resina de intercambio aniónico puede usarse según las siguientes condiciones (tablas 1-2).

Carga de columna: máx. 0,5 mg de ADAMTS13 Ag/ml de resina; altura de lecho: 20 cm

Tabla 1

Etapas	Tampón	Volumen de columna (VC)	Velocidad de flujo (cm/h)
Activación de la columna	ANX-HS	2	100
Equilibrio	ANX-Equi	6	100
Carga	CCS concentrado y diafiltrado		
Lavado 1	ANX-W1	2,5	100
Lavado 2	el 12,5% de ANX-EluB/el 87,5% de ANX-EluA	3	100
Gradiente de elución	del 12,5% de ANX-EluB/el 87,5% de ANX-EluA al 100% de ANX-EluB	11	100
Después de la elución	ANX-HS	3	100

Alternativamente, puede usarse elución por etapas con 2,8 volúmenes de columna de un tampón que comprende el 48% de ANX-EluB y el 52% de ANX-EluA, tal como se detalla en la tabla 2. También se indican otros tampones potencialmente adecuados.

Tabla 2

Tampón	Formulación
ANX-Equi	Tris 20 mM, polisorbato 80 al 0,1%, NaCl 50 mM, CaCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 5 µM, pH=7,7 (temp. ambiente)
ANX-W1	Tris 20 mM, polisorbato 80 al 0,1%, NaCl 50 mM, pH=7,7 (temp. ambiente)
ANX-EluA	Na/K PO ₄ 20 mM, pH=7,0 (temp. ambiente)
ANX-EluB	Na/K PO ₄ 20 mM, NaCl 400 mM, pH=7,0 (temp. ambiente)
ANX-HS	NaCl 2 M

Pueden usarse diferentes resinas de las indicadas en la figura 1, etapa 102. Por ejemplo, pueden usarse POROS 50D y POROS 50PI de Applied Biosystems, Foster City, CA. El eluato de la cromatografía de intercambio aniónico previa al enriquecimiento que usa esta resina puede proporcionar ADAMTS13 recombinante con una pureza de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 70%, y el rendimiento en porcentaje después de esta preparación de la muestra previa al enriquecimiento puede ser de al menos aproximadamente el 75%.

Enriquecimiento de ADAMTS13

Tal como se muestra en la figura 1, etapas 103 y 104, respectivamente, ADAMTS13 puede enriquecerse luego mediante las etapas (a) y (b) de pulido. La muestra que comprende ADAMTS13 se somete a cromatografía en tándem, primero con hidroxapatita en una columna de hidroxapatita tipo II (Biorad, Hercules, CA), etapa 103, seguida por cromatografía de modo mixto en una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba CAPTO™ MMC (GE Healthcare), etapa 104. Más específicamente, el conjunto de eluato de la cromatografía de intercambio aniónico previa al enriquecimiento de la etapa 102 se diluye 1:4 con tampón de dilución de hidroxapatita para reducir la conductividad hasta aproximadamente 6 mS/cm. El conjunto de eluato diluido se somete a cromatografía en tándem con hidroxapatita en condiciones que permitan que una porción sustancial de proteína ADAMTS13 fluya

a través, etapa 103, seguida por una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba de modo mixto que se une a la proteína ADAMTS13, etapa 104. Las condiciones para la cromatografía en tándem se proporcionan a continuación y en las tablas 3-4.

- 5 Columna 1: resina: hidroxiapatita tipo II (Biorad) (HA); carga: máx. 2 mg de proteína total/ml de resina; altura de lecho: 20-30 cm.

Columna 2: resina: Capto MMC (GE Healthcare); carga: 3 - 6 mg de ADAMTS13/ml de resina; altura de lecho: 10 cm.

10

Razón de volumen de columna HA:MMC = 10:1.

Tabla 3

Etapa	Tampón	Volumen de columna (VC)	Velocidad de flujo (cm/h)
Activación (MMC)	MMM-Elución	3 (MMC)	50 (MMC)
Equilibrio	HA-Equi.	4 (HA)	50 (HA)
Equilibrio	HA-Equi.	1 (HA)	50 (HA)
Carga	Eluato de captura diluido (diluido 1:5) con HA-Equi.) < 6 mS/cm de conductividad	20 - 30 l	30 (HA)
Reequilibrio	HA-Equi.	0,5 (HA)	30 (HA)
Lavado 1 (MMC)	MMC-Equi.	3 (MMC)	50 (MMC)
Lavado 2 (MMC)	MMC-Lavado	4 (MMC)	50 (MMC)
Elución (MMC)	75% de tampón de elución MMC/25% de tampón de lavado MMC	4 (MMC)	50 (MMC)

15

Tabla 4

Tampón	Formulación	Conductividad
HA-Dilución	Na/K PO ₄ 20 mM, pH 7,0 (temp. ambiente)	
TÁNDEM-Equi.	Na/K PO ₄ 20 mM, NaCl 25 mM, pH 7,0 (temp. ambiente)	Aproximadamente 5,5 mS/cm (temp. ambiente)
MMC-Lavado	Na/K PO ₄ 50 mM, NaCl 160 mM, pH 8,0 (temp. ambiente)	Aproximadamente 16,5 mS/cm (temp. ambiente)
MMC-Elución	Na/K PO ₄ 50 mM, NaCl 1000 mM, pH 8,0 (temp. ambiente)	Aproximadamente 93 mS/cm (temp. ambiente)
HA-Elución	K PO ₄ 300 mM, pH 7,0 (temp. ambiente)	Aproximadamente 33 mS/cm (temp. ambiente)

20 El rendimiento en porcentaje de ADAMTS13 después del enriquecimiento mediante cromatografía en tándem puede ser de al menos el 60%.

Inactivación del virus

25 Tal como se muestra en la figura 1, etapa 105, la muestra puede someterse a tratamiento con disolvente-detergente para inactivar los virus contaminantes o partículas virales; y/o la muestra se filtra para eliminar tales virus o partículas virales. Además, tal como se muestra en la figura 1, la etapa 105 de inactivación del virus puede llevarse a cabo en diversos puntos en el procedimiento, por ejemplo, antes de las etapas 103 y 104 de cromatografía en tándem, o después de una etapa que implica concentración e intercambio de tampón, etapa 106, tal como se describe a continuación.

30

Para la inactivación del virus mediante tratamiento con disolvente-detergente, la muestra se trata con una mezcla disolvente-detergente que comprende Triton X-100® al 1%, tri-N-butilfosfato al 0,3% y polisorbato 80 al 0,3%, durante 30 minutos a de aproximadamente 12°C a aproximadamente 16°C (específicamente para inactivar virus con envoltura lipídica). Detalles adicionales se proporcionan a continuación en el ejemplo 2.

35

Alternativamente, o además, la muestra se somete a filtración, por ejemplo, nanofiltración a través de un filtro de partículas de 0,2 µm. Por ejemplo, la mezcla después del tratamiento con disolvente-detergente se diluye con 1 volumen de un tampón de equilibrio de pulido, descrito a continuación, y se filtra a través de una membrana de PVDF o PES de 0,2 µm. La filtración puede llevarse a cabo antes y/o después del tratamiento con disolvente-detergente. La filtración después del tratamiento puede usarse para eliminar la materia particulada que puede haberse formado durante el tratamiento. La filtración también puede llevarse a cabo mediante nanofiltración usando

40

un filtro de 20 N (Planova, Asahi Kasei), tal como se muestra también en la figura 1, en la que la etapa 105 de inactivación del virus se lleva a cabo antes de las etapas 103 y 105 de la cromatografía en tándem. Una etapa 105 de inactivación del virus adicional puede llevarse a cabo después de que la muestra se haya pulido mediante cromatografía de intercambio catiónico, tal como se describe a continuación.

El rendimiento en porcentaje de ADAMTS13 de esta inactivación del virus puede ser de al menos el 95%.

Pulido mediante cromatografía de intercambio catiónico

Tras el enriquecimiento, la ADAMTS13 puede pulirse mediante cromatografía en una resina de intercambio catiónico, y la conductividad del tampón que comprende ADAMTS13 puede reducirse antes del pulido, para lograr una conductividad apropiada para la cromatografía de intercambio catiónico. Por consiguiente, las etapas posteriores al enriquecimiento pueden implicar (a) reducción de la conductividad del tampón; seguido por (b) cromatografía de intercambio catiónico.

(a) Reducción de la conductividad del tampón

Tal como se muestra en la figura 1, etapa 106, la preparación para la cromatografía de intercambio catiónico puede implicar concentración e intercambio de tampón, usando UF/DF, con un valor de corte de 10 kDa y un hardware Dialyzer. En la realización ilustrada, el hardware Dialyzer usado para el intercambio de tampón implica un módulo de hemodiálisis de fibras huecas (serie Aquamax, PES chemistry of the Hollowfibers, Edwards Lifesciences, Unterschleißheim, Alemania) que tiene un área de filtro de 0,3 - 1,9 m². Durante la operación, se monitorizan en línea los siguientes parámetros: presión (antes del módulo, después del módulo y presión transmembrana), conductividad y temperatura. El cartucho de dializador se conecta con dos bombas, una que alimenta la muestra (a través de las fibras huecas) y una que alimenta el tampón de diálisis (que rodea las fibras huecas, en dirección inversa al flujo). Se usan aproximadamente 2 m² de área de filtro para aproximadamente 5 l de muestra; y el flujo de fluido se fija del siguiente modo: 40 ml/min (flujo de muestra o 20 ml/min/m² de área de filtro), 60 ml/min (flujo de tampón de diálisis, flujo inverso). Antes y después de la diálisis, el módulo de fibras huecas se enjuaga con tampón de diálisis y el enjuague después de la diálisis se añade al producto recogido. Después de la diálisis, la muestra tiene aproximadamente el mismo volumen que antes, aunque está ligeramente concentrada.

El rendimiento en porcentaje de ADAMTS13 después de la reducción de la conductividad del tampón de este modo puede ser de aproximadamente el 90%.

En otras realizaciones, el intercambio de tampón puede llevarse a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico en ANX Sepharose-FF low sub, como en la etapa 102.

Cromatografía de intercambio catiónico

Tal como se muestra en la figura 1, etapa 107, después del enriquecimiento de proteína ADAMTS13 (y la etapa 106 de concentración e intercambio de tampón opcional y/o la etapa 105 de inactivación del virus), la muestra puede pulirse mediante cromatografía de intercambio catiónico. El tampón que comprende proteína ADAMTS13 se pule o bien en una columna Source S (GE Healthcare) o bien en una columna POROS® S, tal como en una columna POROS® 50 HS (Applied Biosystems).

Las condiciones para el pulido en la columna Source 30S se proporcionan en la tabla 5 y los tampones para la etapa de pulido se proporcionan en la tabla 6.

Resina: Source 30 S (GE Healthcare); carga de columna load: máx. 0,2 (0,5) mg de ADAMTS13/ml de resina; altura de lecho: 20 cm.

Tabla 5

Etapa	Tampón	Volumen de columna (VC)	Velocidad de flujo (cm/h)
Activación de la columna	NaCl 2 M	2	32
Equilibrio	SOS-Equi.	6	32
Carga			32
Lavado	SOS-Equi.	3	32
Elución (gradiente)	del 100% de SOS-Equi./0% de SOS-Elu. al 0% de SOS-Equi./100% de SOS-Elu.	5	19
Después de la elución	SOS-Elu.	3	32

Tabla 6

Tampón	Formulación	Comentarios
SOS-Equi.	MES 20 mM, pH 6,0 (temp. ambiente)	El tampón puede contener NaCl 10 mM, CaCl ₂ 2 mM
SOS-Elu.	MES 20 mM, NaCl 500 mM, CaCl ₂ 2 mM, pH 6,0 (temp. ambiente)	

El conjunto de eluato de la columna Source S se concentra y diafiltra frente al tampón de almacenamiento.

Las condiciones para el pulido en la columna POROS® S se proporcionan en la tabla 7 y los tampones para la etapa de pulido se proporcionan en la tabla 8.

Resina: POROS® S (Applied Biosystems, Foster City, CA); carga de columna: máx. 12 mg de ADAMTS13/ml de resina; altura de lecho: 20 cm.

Tabla 7

Etapas	Tampón	Volumen de columna (VC)	Velocidad de flujo (cm/h)
Activación de la columna	NaCl 2 M	5 VC	50
Equilibrio	Poros Equi.	10 VC (hasta que el pH u la conductividad proporcionen señales uniformes y estables)	50
Carga	MMC-Eluato después del tratamiento con disolvente-detergente y dilución	Conductividad de menos de 5 mS/cm (temp. ambiente)	32
Reequilibrio	Poros Equi.	5 VC	32
Lavado 1	Poros Lavado 1	5 VC	32
Lavado 2	Poros Lavado 2	7 VC	32
Elución	Poros Elu.	5 VC	19
Después de la elución	NaCl 2 M	3 VC	32

Tabla 8

Poros Equi.	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, Tween 80 al 0,1%, pH 6,0 (temp. ambiente), conductividad de aproximadamente 3,9 mS/cm a 25°C
Poros Lavado 1	L-histidina 20 mM, NaCl 5 mM, CaCl ₂ 2 mM, Tween 80 al 0,05%, pH 6,0 (temp. ambiente), conductividad de aproximadamente 1,9 mS/cm a 25°C
Poros Lavado 2	L-histidina 20 mM, NaCl 5 mM, CaCl ₂ 2 mM, Tween 80 al 0,05%, pH 7,5 (temp. ambiente), conductividad de aproximadamente 1,9 mS/cm a 25°C
Poros Elu.	L-histidina 20 mM, NaCl 300 mM, CaCl ₂ 2 mM, Tween 80 al 0,05%, pH 7,5 (temp. ambiente), conductividad de aproximadamente 18 mS/cm a 25°C

El conjunto de eluato de la columna POROS® S se concentra y diafiltra frente al tampón de almacenamiento.

El rendimiento en porcentaje de ADAMTS13 después de esta etapa de pulido adicional puede ser de al menos aproximadamente el 70%, y después del intercambio de tampón, de al menos aproximadamente el 90%.

Tal como se muestra en la figura 1, etapa 108, se obtiene una proteína ADAMTS13 purificada según el método descrito anteriormente. La ADAMTS se congela y almacena, por ejemplo, a menos de aproximadamente -60°C. El rendimiento del procedimiento completo puede ser de aproximadamente el 22% a aproximadamente el 24% o más.

Ejemplo 2

La figura 2 proporciona un resumen de diversas condiciones que pueden usarse con la etapa 107 de cromatografía de intercambio catiónico de la figura 1. En particular, la comparación del producto de ADAMTS13 obtenido de las diversas ejecuciones indica que las condiciones de la figura 2C reducen los agregados contaminantes.

Tal como se muestra en la figura 2A, la variación A es una combinación de inactivación viral usando tratamiento con disolvente-detergente (S/D), tal como se comenta en más detalle a continuación, seguida por una cromatografía de intercambio catiónico en Poros S aplicando una elución por etapas. Tal como se muestra en la figura 2B, la variación B implica cromatografía de intercambio catiónico en Poros 50S, con dilución por etapas, pero sin una inactivación del virus previa. Ambas variaciones A y B pueden realizarse según un procedimiento destacado en la tabla 9.

Tabla 9

	Volumen de tampón (VC)	Composición del tampón	Velocidad de flujo (cm/h)	Observaciones
Activación	5	NaCl 2 M	50	
Equilibrio	6	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, pH 6,0 (temp. ambiente)	50	
Carga del producto	aproximadamente 12	Disolución de producto tratada con S/D y diluida	32	Carga de columna máx. de 6 mg de ADAMTS13/ml de resina
Lavado 1	10	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, pH 6,0 (temp. ambiente)	32	
Lavado 2	8	L-histidina 20 mM, NaCl 30 mM, CaCl ₂ 2 mM, Tween 80 al 0,05%, pH 7,0 (temp. ambiente)	32	
Elución por etapas	5	L-histidina 20 mM, NaCl 200 mM, CaCl ₂ 2 mM, Tween 80 al 0,05%, pH 7,5 (temp. ambiente)	25	El agrupamiento comienza después de que la señal UV ₂₈₀ aumente significativamente y el agrupamiento finaliza después de que la señal UV ₂₈₀ caiga por debajo del 5% de la señal UV ₂₈₀ en el pico máximo (aproximadamente 1 VC)

- 5 En la variación A, el eluato acondicionado (dializado) de la etapa 106 se somete a una etapa 105 de inactivación del virus con disolvente-detergente. En primer lugar, el eluato se filtra a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,2 μ para eliminar la materia particulada. A continuación, el filtrado se complementa con una mezcla disolvente-detergente hasta concentraciones finales de Triton X-100 al 1%, fosfato de tri-N-butilo al 0,3% y polisorbato 80 al 0,3% (Tween 80) a partir de disoluciones madre. La inactivación se realiza a temperaturas que oscilan desde
- 10 aproximadamente 12°C hasta aproximadamente 25°C en un margen de tiempo de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente una hora con agitación o sacudida ligera. La inactivación se detiene diluyendo la disolución con un volumen de tampón de dilución frío (MES 20 mM, pH 6,0, temp. ambiente). Para proteger la columna, la disolución de disolvente-detergente tratada y diluida se filtra de nuevo con un filtro de 0,2 μ , por ejemplo, para eliminar la materia particulada que puede haberse formado durante el tratamiento de inactivación del virus.
- 15 La disolución de producto diluida e inactivada de disolvente-detergente se somete luego a una etapa 107 de cromatografía de intercambio catiónico en Poros 50HS, usando dilución por etapas. Los detalles cromatográficos se destacan en la tabla 9 anterior. El conjunto de eluato resultante proporciona la proteína ADAMTS13 en forma de principio activo a granel, que puede almacenarse congelado a menos de -60°C.
- 20 En la variación B, la etapa 107 de cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo en el eluato acondicionado (dializado) de la etapa 106, sin la etapa 105 de inactivación del virus con disolvente-detergente. Los detalles para la cromatografía de intercambio catiónico son tal como se detalló anteriormente.
- 25 Tal como se muestra en la figura 2C, la variación C es una combinación que implica purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico en Poros 50HS, usando elución en gradiente, seguida por inactivación del virus con disolvente-detergente en columna. Esta variación reduce sorprendentemente los agregados distintos encontrados con la proteína ADAMTS13 purificada. Los detalles cromatográficos que pueden usarse con la variación C se destacan en la tabla 10 a continuación.

30
Tabla 10

	Volumen de tampón (VC)	Composición del tampón	Velocidad de flujo (cm/h)	Comentarios
--	------------------------	------------------------	---------------------------	-------------

Activación	5	NaCl 2 M	50	
Equilibrio	6	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, pH 6,0 (temp. ambiente)	50	
Carga del producto	aproximadamente 6	Conjunto de eluato dializado de la purificación en Capto MMC	32	Carga de columna máx. de 6 mg de ADAMTS13/ml de resina
Lavado 1	10	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, pH 6,0 (temp. ambiente)	32	
Lavado 2	1,5	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, Triton X-100 al 1%, TNBP al 0,3%, Tween 80 al 0,3%, pH 6,0 (temp. ambiente)	32	
Lavado 3	2,1	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, Triton X-100 al 1%, TNBP al 0,3%, Tween 80 al 0,3%, pH 6,0 (temp. ambiente)	20	Tratamiento con S/D: 1 hora de tiempo de contacto con los productos químicos de S/D
Lavado 4	10	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, pH 6,0 (temp. ambiente)	32	Eliminación de los productos químicos de S/D
Lavado 5 (tampón A)	8	Histidina 20 mM, NaCl 30 mM, CaCl ₂ 2 mM, Tween 80 al 0,1%, pH 7,0 (temp. ambiente)	32	Acondicionamiento de la columna para la elución
Elución por etapas	10	Gradiente desde el 100% de tampón A hasta el 100% de tampón B (histidina 20 mM, NaCl 300 mM, CaCl ₂ 2 mM, Tween 80 al 0,1%, pH 7,5 (temp. ambiente)), en 10 VC	32	El agrupamiento comienza después de que la señal UV ₂₈₀ aumente significativamente y el agrupamiento finaliza después de que la señal UV ₂₈₀ caiga por debajo del 5% de la señal UV ₂₈₀ en el pico máximo (aproximadamente 2-3 VC)

En la variación C, el material de carga es el conjunto de eluato de la etapa 104 de pulido de intercambio catiónico y preferiblemente tiene una conductividad por debajo de 4,5 mS/cm, lograda mediante diálisis o intercambio de tampón mediante filtración en gel. En particular, la cromatografía de intercambio catiónico en Poros S se adapta para incluir un tratamiento con disolvente-detergente en columna, que implica la inactivación del virus del virus inmovilizado en la columna cromatográfica, tal como se comentó anteriormente. La inactivación del virus en columna comprende un lavado durante una hora con la mezcla disolvente-detergente a de 2°C a 10°C. Después del tratamiento en columna, el tampón de lavado se cambia para eliminar por lavado eficazmente los productos químicos del disolvente-detergente antes de la elución.

La elución se cambia de elución por etapas con NaCl 200 mM a una elución en gradiente, que se cree que facilita la separación de especies monoméricas y oligoméricas de ADAMTS13, particularmente en la parte descendente del pico de elución. Los agregados se eliminan en la última fracción de elución, eliminándose de ese modo adicionalmente los agregados distintos encontrados con la proteína ADAMTS13 purificada. Como adaptación adicional para estabilizar la proteína ADAMTS13 monomérica, la concentración de Tween 80 en el tampón de elución se aumenta desde el 0,05% hasta el 0,1% en los tampones de lavado y de elución. Se cree que esto evita además la formación de agregados durante la elución de ADAMTS13 de la resina Poros S. Los detalles del procedimiento cromatográfico en Poros S, incluyendo la inactivación del virus mediante tratamiento con disolvente-detergente en columna, se destacan en la tabla 10 anterior.

Tal como se muestra en la figura 2D, la variación D sirve como control. En la variación D, la etapa 107 de pulido mediante cromatografía de intercambio catiónico se realiza en Poros 50 HS de nuevo con elución en gradiente y Tween 80 aumentado en el tampón de elución, pero sin inactivación del virus en columna mediante tratamiento con

disolvente-detergente. En su lugar, se realiza una etapa 105 de tratamiento con disolvente-detergente de inactivación del virus en la recolección concentrada antes del intercambio catiónico. Los detalles cromatográficos se proporcionan en la tabla 11 a continuación.

5 Tabla 11

	Volumen de tampón (VC)	Composición del tampón	Velocidad de flujo (cm/h)	Comentarios
Activación	5	NaCl 2 M	50	
Equilibrio	6	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, pH 6,0 (temp. ambiente)	50	
Carga del producto	aproximadamente 6	Conjunto de eluato dializado de la purificación en Capto MMC	32	Carga de columna máx. de 6 mg de ADAMTS13/ml de resina
Lavado 1	10	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, pH 6,0 (temp. ambiente)	32	
Lavado 2 (tampón A)	10	Histidina 20 mM, NaCl 30 mM, CaCl ₂ 2 mM, Tween 80 al 0,1%, pH 7,0 (temp. ambiente)	32	Acondicionamiento de la columna para la elución
Elución por etapas	10	Gradiente desde el 100% de tampón A hasta el 100% de tampón B (histidina 20 mM, NaCl 300 mM, CaCl ₂ 2 mM, Tween 80 al 0,1%, pH 7,5 (temp. ambiente)), en 10 VC	32	El agrupamiento comienza después de que la señal UV ₂₈₀ aumente significativamente y el agrupamiento finaliza después de que la señal UV ₂₈₀ caiga por debajo del 5% de la señal UV ₂₈₀ en el pico máximo (aproximadamente 2-3 VC)

10 En la variación D, el material de carga es el conjunto de eluato de la etapa 104 de pulido de intercambio catiónico y preferiblemente tiene una conductividad por debajo de 4,5 mS/cm, lograda mediante diálisis o intercambio de tampón mediante filtración en gel. La etapa 107 de cromatografía de intercambio catiónico en Poros S de nuevo usa elución en gradiente, en lugar de elución por etapas, así como Tween 80 al 0,1% en los tampones de lavado y de elución, tal como se describió anteriormente. Los detalles del procedimiento cromatográfico en Poros S con elución en gradiente se destacan en la tabla 11 anterior.

15 Ejemplo 3

Se realizaron experimentos a escala de laboratorio, usando una escala de fermentador de 100 l, con la inactivación del virus con disolvente-detergente en columna, para determinar el posible impacto de este procedimiento en el rendimiento de la etapa 107 de cromatografía de intercambio catiónico. Los datos se presentan en la tabla 12.

20

Tabla 12

Muestra	Procedimiento o con disolvente-detergente	Rendimiento de Poros S*		Actividad específica	Impurezas de CHO HCP		Agregados		
		% de A13 Ag	% de unidades des Frets de A13		ng de CHO HCP/unidad de A13	ng de CHO HCP/mg de A13 Ag	% de multímeros	% de dímeros	% de monómero
1	Tratamiento	99	100	696	0,49	346	9,7	7,0	83,3

	con disolvente-detergente inmediatamente antes de la cromatografía en Poros S (variación A)								
2	Sin tratamiento con disolvente-detergente (variación B)	133	154	894	0,58	519	1,3	4,6	94,1
3	Tratamiento con disolvente-detergente en columna (Poros S) (variación C)	89	95	931	0,60	561	1,0	2,3	96,7
4	Tratamiento con disolvente-detergente en la recolección concentrada (variación D)	87	117	905	0,39	354	1,0	3,7	95,3
5		65	93	764	0,21	163	0,8	1,5	97,7
6		81	108	845	0,38	324	0,7	1,5	97,8
7		66	131	741	0,31	231	0,2	1,1	98,7
*Rendimientos por encima del 100% reflejan un problema de ensayo con la fracción de carga cromatográfica en Poros 50S. A13 Ag: antígeno de ADAMTS13 A13 Frets: unidades Frets de ADAMTS13 CHO HCP: proteínas de la célula huésped de ovario de hámster chino									

Tal como se muestra en la tabla 12, realizar la inactivación del virus mediante tratamiento con disolvente-detergente en disolución, antes de la cromatografía de intercambio catiónico en Poros S, puede dar como resultado la formación de altas cantidades de agregados (variación A de la figura 2A y muestra 1). Si se omite el tratamiento con disolvente-detergente y se lleva a cabo el mismo procedimiento, la formación de agregados se reduce significativamente (variación B de la figura 2B y muestra 2).

Realizar el tratamiento con disolvente-detergente en columna, es decir, poner en contacto la ADAMTS13 con la mezcla disolvente-detergente mientras se inmoviliza sobre la superficie de la resina, también puede evitar la formación de agregados. Además, las pequeñas cantidades de agregados que se forman pueden eliminarse adicionalmente mediante elución en gradiente en la última fracción de elución (variación C de la figura 2C; muestras 3 y 4).

A modo de comparación, se lleva a cabo un tratamiento con disolvente-detergente en disolución convencional, el procedimiento de purificación, seguido por cromatografía de intercambio catiónico en Poros S sin tratamiento con disolvente-detergente ni inmediatamente antes ni en columna (variación D de la figura 2D, muestras 5, 6 y 7). Este procedimiento también puede producir ADAMTS13 con un bajo contenido de agregados.

REIVINDICACIONES

1. Método para purificar proteína similar a desintegrina A y metalopeptidasa con motivo 13 de trombospondina tipo 1 (ADAMTS13) recombinante de una muestra que comprende proteína ADAMTS13 e impurezas que no son de ADAMTS13, comprendiendo el método poner en contacto de manera cromatográfica la muestra con hidroxapatita en condiciones que permitan que dicha proteína ADAMTS13 aparezca en un eluato o un sobrenadante de dicha hidroxapatita y poner en contacto de manera cromatográfica además dicho eluato o sobrenadante con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba que une dicha proteína ADAMTS13.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende además poner en contacto de manera cromatográfica dicha muestra con una resina de intercambio aniónico y eluir dicha proteína ADAMTS13 de dicha resina de intercambio aniónico antes del contacto cromatográfico con dicha hidroxapatita.
3. Método según cualquier reivindicación anterior, que comprende además concentrar dicha proteína ADAMTS13 en dicha muestra mediante ultrafiltración; y estabilizar dicha proteína ADAMTS13 mediante intercambio de diafiltración en un tampón que comprende iones de calcio e iones de zinc antes del contacto cromatográfico con dicha hidroxapatita.
4. Método según cualquier reivindicación anterior, que comprende además, tras el contacto con dicha hidroxapatita o dicha resina de intercambio catiónico/interacción hidrófoba, la etapa de preparar dicha proteína ADAMTS13 para intercambio catiónico reduciendo la conductividad del tampón.
5. Método según la reivindicación 4, en el que dicha etapa de preparación se realiza mediante
 - (a) ultrafiltración/diafiltración;
 - (b) diálisis, consistiendo dicha diálisis en no más de 2 pases a través de un único módulo de diálisis; y/o
 - (c) filtración en gel.
6. Método según cualquier reivindicación anterior, que comprende además someter dicha proteína ADAMTS13 a al menos una etapa de inactivación del virus o etapa de eliminación del virus, comprendiendo preferiblemente dicha etapa de inactivación del virus añadir una mezcla disolvente-detergente que comprende un detergente no iónico y un disolvente orgánico a dicha proteína ADAMTS13, en el que dicha mezcla disolvente-detergente comprende preferiblemente Triton X-100 al 1%, fosfato de tri-N-butilo al 0,3% y polisorbato 80 al 0,3%; y/o en el que dicha etapa de inactivación del virus comprende preferiblemente filtrar dicha proteína ADAMTS13 con un nanofiltro para eliminar virus y/o partículas virales, o tanto virus como partículas virales.
7. Método según la reivindicación 6, en el que dicha proteína ADAMTS13 se inmoviliza durante dicha etapa de inactivación del virus.
8. Método según la reivindicación 6 ó 7, en el que dicha proteína ADAMTS13 se inmoviliza, preferiblemente en una resina de intercambio catiónico.
9. Método según las reivindicaciones 6, 7 u 8, en el que dicha etapa de inactivación del virus se realiza después de dicha etapa de preparación.
10. Método según la reivindicación 8 ó 9, que comprende además eluir dicha proteína ADAMTS13 de dicha resina usando elución en gradiente, usando dicha elución en gradiente un primer tampón que tiene un bajo contenido de sales y un segundo tampón que tiene un mayor contenido de sales; y/o que comprende además eluir dicha proteína ADAMTS13 de dicha resina usando elución por etapas, en el que dicha elución por etapas comprende preferiblemente eluir dicha proteína ADAMTS13 de dicha resina con un tampón de almacenamiento; teniendo preferiblemente dicho tampón de almacenamiento un pH mayor de 7,0 y comprendiendo menos de 10 mM de iones de calcio, un compuesto de tamponamiento, detergente no iónico al 0,05% y una sal.
11. Método según la reivindicación 10, en el que no hay una etapa de ultrafiltración, diafiltración o intercambio de tampón posterior a la etapa de elución de la resina de intercambio catiónico con el tampón de almacenamiento.
12. Método según la reivindicación 7, en el que
 - (a) dicha proteína ADAMTS13 se inmoviliza sobre un soporte;

(b) dicha mezcla disolvente-detergente comprende Triton X-100 al 1%, fosfato de tri-N-butilo al 0,3% y polisorbato 80 al 0,3%; y/o

5 (c) dicha proteína ADAMTS13 se incuba en dicho tratamiento con mezcla disolvente-detergente durante de 30 minutos a 1 hora.

10 13. Método según la reivindicación 12, que comprende además eluir dicha proteína ADAMTS13 de dicho soporte con un tampón de almacenamiento, teniendo preferiblemente dicho tampón de almacenamiento un pH mayor de 7,0 y comprendiendo menos de 10 mM de iones de calcio, un compuesto de tamponamiento, detergente no iónico al 0,05% y una sal.

14. Método según la reivindicación 13, en el que no hay etapa de intercambio de tampón o de concentración posterior.

FIG. 1

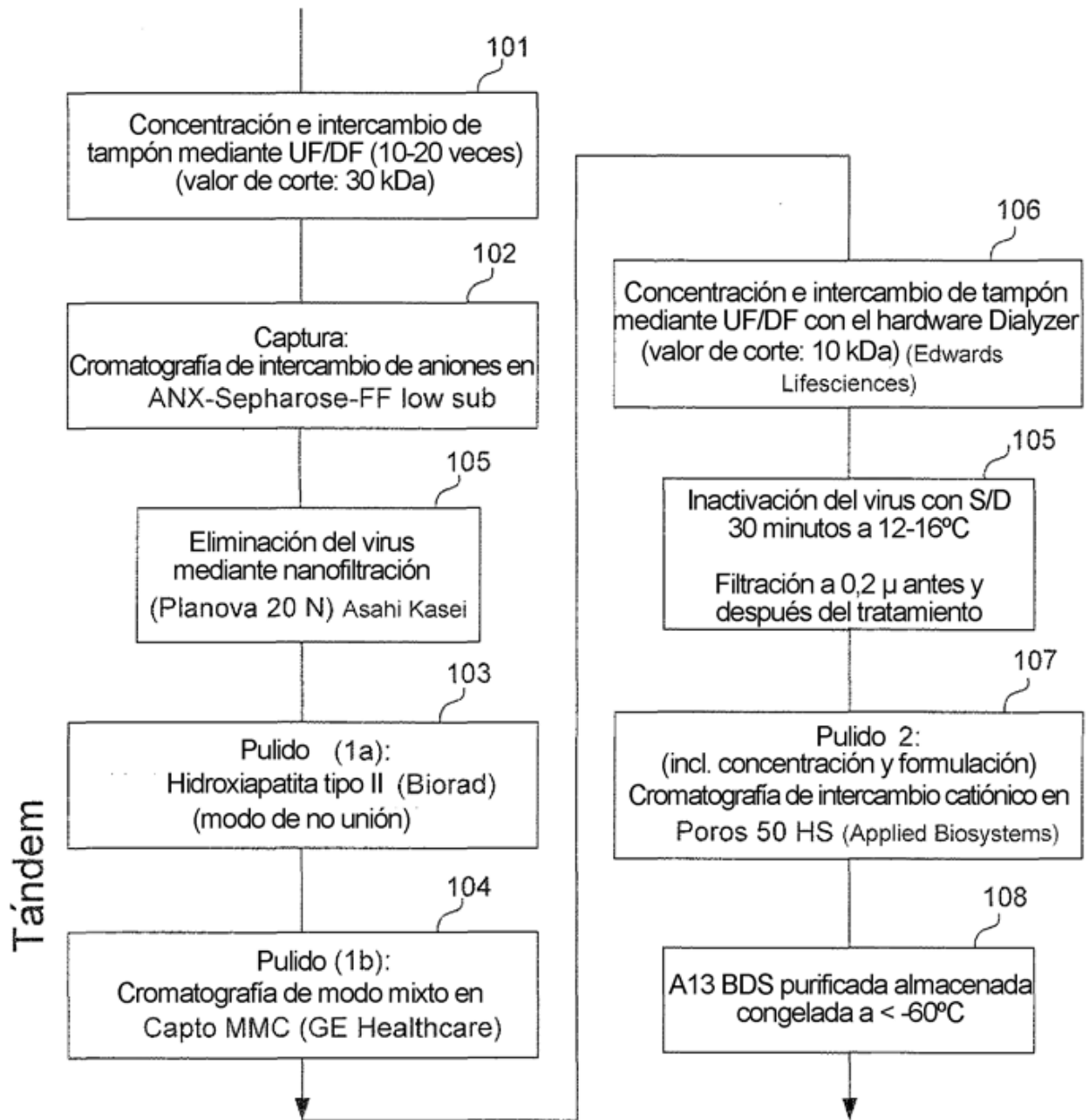


FIG. 2

