

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 284**

51 Int. Cl.:

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/505 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2012 PCT/JP2012/066543**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013 WO13002330**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2012 E 12804564 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 2727930**

54 Título: **Método para purificar antitrombina**

30 Prioridad:

29.06.2011 US 201161502426 P

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

20.07.2020

73 Titular/es:

**KYOWA KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-9-2, Otemachi, Chiyoda-ku
Tokyo, JP**

72 Inventor/es:

**SUGIHARA, TSUTOMU;
ISODA, TOMOKO;
TANIGUCHI, YUYA;
NOMURA, HIDETAKA y
SUZAWA, TOSHIYUKI**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 774 284 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 antitrombina

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a la purificación de proteínas. Más particularmente, se proporciona un método para recuperar directamente una proteína objetivo de una composición de proteína, y purificar eficientemente una proteína con una calidad deseada.

10

Técnica anterior

El desarrollo de tecnologías de recombinación genética ha proporcionado una variedad de sustancias farmacéuticas proteínicas. En particular, numerosas sustancias farmacéuticas de anticuerpos y proteínas se han desarrollado y comercializado recientemente. Preparar estas sustancias farmacéuticas proteínicas de manera industrial y económica y con una alta pureza se ha convertido en un aspecto más importante en la industria biofarmacéutica.

15

Generalmente, estas sustancias farmacéuticas de anticuerpos o proteínas se producen cultivando células recombinantes en las que se inserta un vector que incluye un gen de proteína objetivo. El fluido de cultivo incluye impurezas tales como diversos componentes del medio, subproductos celulares o similares, además de la proteína objetivo. Por lo tanto, es muy difícil y desafiante realizar el aislamiento y la purificación para cumplir con los requisitos de pureza de las sustancias farmacéuticas, y combinar además la producción a escala industrial y la eficiencia económica.

20

25

En el método de preparación de la proteína objetivo, el proceso de purificación es un proceso muy importante para aumentar la pureza de la proteína mientras se mantienen sus funciones fisiológicas. En general, el proceso de purificación se lleva a cabo mediante una combinación de diferentes modos de cromatografía basados en diferencias de carga, hidrofilia o tamaño molecular, y una manipulación tal como fraccionamiento de alcohol, precipitación salina, filtración, concentración o dilución, y similares (documento 1 no de patente).

30

La cromatografía puede ejemplificarse mediante cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de fase inversa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de modo mixto, y similares. Se puede llevar a cabo una combinación de las mismas para purificar la proteína objetivo con una pureza deseada. En la cromatografía de afinidad, se usa un portador, sobre el que se inmoviliza una sustancia que tiene afinidad por la proteína objetivo, tal como anticuerpo o heparina.

35

Si la proteína objetivo es un anticuerpo, se usa un portador, en el que se inmoviliza un ligando (sustancia de afinidad) que interactúa con una región específica del anticuerpo, tal como la proteína A o la proteína G. Además, considerando la interacción entre el portador o amortiguador usado en estas cromatografías y la proteína e impurezas objetivo, se pueden emplear dos métodos; un modo de captura para adsorber la proteína objetivo sobre el portador y a continuación eluirlo, y un modo de flujo continuo para adsorber impurezas sobre el portador y luego hacer pasar la proteína objetivo a través del portador.

40

45

En particular, si la proteína objetivo es un anticuerpo, ya se ha establecido cómo purificar un objeto con una pureza deseada mediante cromatografía de afinidad de proteína A y mediante combinaciones de una o más de las cromatografías descritas anteriormente, y esta tecnología se ha usado como un método de purificación de plataforma.

50

Por otra parte, si la proteína objetivo son proteínas distintas de los anticuerpos, no existe un método estándar como el método de purificación de plataforma de la proteína con la pureza deseada. Considerando las características de la proteína objetivo, un proceso de purificación se diseña repitiendo una prueba por ensayo y error respectivamente, y se optimiza para cada proteína objetivo respectivamente, y luego se aplica de forma práctica.

55

La cromatografía de afinidad que usa un anticuerpo que tiene afinidad por la proteína objetivo asimismo se ha usado para la purificación. Sin embargo, existen muchos problemas por los que debe usarse un ligando (sustancia de afinidad) específico para la proteína objetivo, no siempre es fácil obtener un ligando que tenga una propiedad o afinidad de unión deseada, un portador que se una con el ligando es considerablemente costoso, y existe una preocupación por su suministro estable. Por lo tanto, no es fácil lograr su aplicación industrial.

60

En este contexto, existe la necesidad de establecer una tecnología estándar capaz de purificar la proteína objetivo de una manera simple, eficiente y rápida.

65

Por otra parte, cuando se usa una cromatografía simple distinta de la cromatografía de afinidad, el pretratamiento del sobrenadante del cultivo celular o similar es esencial para la purificación de la proteína objetivo. Típicamente,

el sobrenadante del cultivo celular incluye una gran cantidad de metabolitos celulares o componentes del medio, y componentes derivados de aditivos durante el cultivo, y en muchos casos, el sobrenadante del cultivo celular tiene alta conductividad o concentración de sal.

5 A este respecto, no es eficiente cargar directamente el sobrenadante de cultivo en la cromatografía, y de este modo, típicamente se lleva a cabo un pretratamiento tal como la dilución varias veces del sobrenadante de cultivo, el intercambio de un amortiguador, el intercambio del amortiguador tras la concentración, la dilución tras la concentración, o similar.

10 Sin embargo, debido a que tales pretratamientos requieren de varias horas a 1 día o más de tiempo de manipulación, y dependen de la instalación de producción, tal como el tamaño del tanque de dilución o similar, los métodos de producción no son eficientes y prácticos en términos de aplicación industrial. Además, la calidad de la proteína objetivo puede deteriorarse durante el pretratamiento del sobrenadante de cultivo, tal como concentración o similar.

15 Como tal, la manipulación del pretratamiento se convierte en un problema desafiante en el método de producción industrial de la proteína con una alta pureza. Existe la necesidad de un método de purificación capaz de recuperar eficientemente la proteína objetivo mediante una manipulación simple del pretratamiento sin dañar la calidad de la proteína.

20 Además, a fin de suministrar y usar la proteína objetivo como medicamento, se requiere que la proteína objetivo esté altamente purificada de una composición tal como fluido de cultivo, a fin de tener una actividad biológica deseada. Sin embargo, la mayoría de las composiciones que contienen la proteína objetivo como punto de partida de purificación, como el fluido de cultivo, incluyen oligoelementos que tienen una actividad proteolítica o impurezas. Si estos componentes no se desactivan o eliminan, existen preocupaciones por el daño en la actividad biológica de la proteína objetivo, una reducción en el rendimiento, modificación, producción de subproductos, o similares. Además, las impurezas se concentran o activan durante el pretratamiento descrito anteriormente del sobrenadante de cultivo, lo que puede deteriorar la proteína objetivo.

30 Los componentes o impurezas pueden ejemplificarse mediante enzimas glucolíticas, enzimas proteolíticas, oxidorreductasas, y similares, que se retienen en las células productoras. Los ejemplos de las enzimas glucolíticas pueden incluir neuraminidasa (sialidasa), galactosidasa, glucanasa, y similares.

35 Los ejemplos de las enzimas proteolíticas pueden incluir serina proteasa, esterasa, cisteína proteasa, proteasa similar a la tripsina, aminopeptidasa, proteasa aspártica, catepsina, y similares.

Los ejemplos de las oxidorreductasas pueden incluir tioredoxina o similares implicados en una reacción en cascada. La aminoácido isomerasa, tal como transglutaminasa o similar, asimismo se conoce como una enzima que modifica estructuras de proteínas.

40 Por ejemplo, la separación rápida de neuraminidasa de una disolución de mezcla de glicoproteína y neuraminidasa se puede realizar en combinaciones de fraccionamiento de alcohol, precipitación salina, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, o cromatografía de afinidad descrita anteriormente, pero el método de purificación estable de la proteína objetivo usando solo estos métodos está extremadamente limitado.

45 Asimismo se puede considerar que se usa un inhibidor enzimático (cationes divalentes tales como cobre, ácido siálico y derivados del mismo, sialil-lactosa, ácido oligosálico, ácido polisálico, Tamiflu, BCX-1812, anticuerpo neutralizante de sialidasa, o similares) para inhibir la actividad enzimática de la neuraminidasa para la purificación. Sin embargo, no es conveniente usar una gran cantidad de estos inhibidores en el proceso de preparación; y durante el proceso de purificación, existe una limitación para eliminarlos hasta una concentración sin toxicidad.

50 Como tal, muchas composiciones, tales como un fluido de cultivo que contiene la proteína objetivo o similar, incluyen una pluralidad de impurezas que dañan la estructura o la estabilidad de la proteína como oligoelementos. Para obtener la proteína con la calidad deseada, estas impurezas deben eliminarse de manera segura, rápida y eficiente.

55 Además, la proteína objetivo degradada o modificada por las impurezas descritas anteriormente, o la proteína objetivo inactivada biológicamente en sí misma, asimismo pueden ser impurezas. En el caso de las glicoproteínas que contienen cadenas de azúcar, se sabe que las cadenas de azúcar están muy involucradas en la actividad fisiológica, la estabilidad, la cinética *in vivo*, la solubilidad, o similar.

60 Cuando las glicoproteínas se producen usando células animales que se preparan mediante la aplicación de la técnica de recombinación genética, la neuraminidasa liberada de las células muertas se incluyen en el fluido de cultivo obtenido. Por lo tanto, el ácido siálico se elimina de las cadenas de azúcar de las glicoproteínas objetivo. Cuando el ácido siálico se elimina de la glicoproteína, el resto de galactosa expuesto al extremo no reductor es

capturado por un receptor de asialoglicoproteína (receptor de galactosa) localizado en el hígado, y es degradado rápidamente (documento 2 no de patente).

5 Como tal, cuando el número de ácidos siálicos unidos en la cadena de azúcar terminal es bajo, la semivida en sangre de las glicoproteínas se reduce, y sus actividades fisiológicas no pueden ejercerse suficientemente. Asimismo es conocido que la actividad biológica de la eritropoyetina o similar depende del número de ácidos siálicos unidos a la cadena de azúcar.

10 De este modo, debido a que las glicoproteínas en las que se eliminan los ácidos siálicos o las glicoproteínas en las que se degrada el número de ácidos siálicos unidos pueden convertirse en impurezas, es necesario eliminar la neuraminidasa para evitar la eliminación del ácido siálico, o eliminar las proteínas que tienen un menor número de enlaces ácidos siálicos, como se describió anteriormente.

15 Es muy difícil y desafiante controlar la composición o el contenido de las cadenas de azúcar de las proteínas por cromatografía. De este modo, existe una demanda de desarrollar un método para purificar las glicoproteínas con una alta pureza mientras se mantienen sus cadenas de azúcar en la calidad deseada.

20 En otro caso, la proteína objetivo desnaturalizada durante el proceso de preparación asimismo puede ser impurezas en sí misma. Por ejemplo, los agregados (o asociados, agregados, dímeros, oligómeros, agregados, multímeros) resultantes de la desnaturalización de las proteínas objetivo durante el proceso de preparación son problemáticos en términos de reducción de la actividad biológica, cambio en la cinética *in vivo*, antigenicidad o similares.

25 Por ejemplo, en el caso de la proteína S, la generación de agregados no puede inhibirse mediante el método de purificación típico, y todavía no se conoce un método de purificación para no generar agregados (documento 3 no de patente). Además, no se ha desarrollado un método de purificación para reducir eficazmente el contenido de una forma escindida (una forma mellada). Por esta razón, se requiere establecer un método de purificación capaz de eliminar las impurezas derivadas de la proteína objetivo, tales como agregados o formas escindidas, a un nivel suficientemente bajo durante el proceso de purificación.

30 En este contexto, existe la necesidad de un método para purificar fácilmente una proteína con una calidad deseada mediante la eliminación de impurezas relacionadas con la calidad de la proteína.

35 Por otra parte, se han desarrollado varios modos de portadores de cromatografía como una tecnología para purificar la proteína objetivo de la composición de proteína con una alta pureza. De ellos, un portador de modo mixto (o portador multimodo) es un portador de cromatografía preparado inmovilizando ligandos a fin de tener dos o más características en un único portador, que se ha desarrollado recientemente.

40 Es conocido que el portador de modo mixto tiene una propiedad de separación única, así como la de los dos modos combinados, y ha sido una herramienta útil para la purificación de proteínas (Documento 4 no de patente).

45 Sin embargo, no se ha dado a conocer un método estándar para purificar otras proteínas, excepto los anticuerpos, que usan el portador de modo mixto. El portador de modo mixto, tal como Capto adhere (fabricado por GE Healthcare), que tiene un grupo de intercambio aniónico y un grupo de interacción hidrófoba, se conoce solo como una purificación posterior tras un proceso de purificación aproximado de la composición de anticuerpo usando cromatografía de proteína A, o similares (documentos 1 a 3 de patente y documento 5 no de patente).

50 En este caso, las impurezas a eliminar son principalmente proteínas derivadas de células hospedantes (HCP) o ADN, y la calidad de la propia proteína objetivo no se puede cambiar, o no se pueden controlar sus ingredientes (documentos 6 y 7 no de patente).

55 Además, el portador de modo mixto tal como Capto MMC (fabricado por GE Healthcare), que tiene un grupo de intercambio catiónico y un grupo de interacción hidrófoba, se conoce como un método para recuperar la proteína objetivo de una composición con alto contenido de sal (documentos 8 y 9 no de patente), y asimismo se usa en la purificación de anticuerpos (documento 4 de patente). Sin embargo, existen muchas limitaciones en el uso en la primera etapa de purificación para eliminar las impurezas relacionadas con la calidad de la proteína, controlar el ingrediente, y obtener la proteína con la calidad deseada.

60 En particular, no se ha dado a conocer un método para recuperar y controlar directamente ácidos siálicos que se unen a cadenas de azúcar de proteínas, agregados o fragmentos de la propia proteína por la primera cromatografía. Además, no se ha dado a conocer un método para purificar proteínas ácidas usando un portador de modo mixto que tenga un grupo de intercambio catiónico, ni un método para purificar proteínas básicas usando un portador de modo mixto que tenga un grupo de intercambio aniónico.

Listado de referencias

Documentos de patente

- 5 [Documento 1 de patente] Publicación internacional WO 2010/071208
 [Documento 2 de patente] Publicación internacional WO 2010/030222
 [Documento 3 de patente] Publicación internacional WO 2006/043895
 [Documento 4 de patente] Publicación internacional WO 2009/126603

10 Documentos no de patente

[Documento 1 no de patente] Robert K. Scopes, Protein Purification Principles and Practice, tercera edición, 1994, Springer-Verlag Nueva York, Inc.

15 [Documento 2 no de patente] Metabolism, 1983, 20, 153.

[Documento 3 no de patente] Kristin M. Sere, George M. Willems, Jan Rosing, Tilman M. Hackeng, Protein S multimers are generated in vitro and affect Protein S structure-function analysis, 2006, Seminars in Hematology 43 (supl 1) S111-S120.

20 [Documento 4 no de patente] Kennedy, L. A., Kopaciewicz, W., Regnier, F. E., Multimodal liquid chromatography columns for the separation of proteins in either the anion-exchange or hydrophobic-interaction mode, 1986, Journal of Chromatography A, Vol. 359, 73-84.

25 [Documento 5 no de patente] Chen J., Tetrault J., Zhang Y., Wasserman A., Conley G., DiLeo M., Haines E., Ley A., The distinctive separation attributes of mixed-mode resins and their application in monoclonal antibody downstream purification process, 2010 J. Chromatogr. A 1217(2), 216-224.

30 [Documento 6 no de patente] GE Healthcare Capto Adhere Data File 71-2779-11, http://www.gelifesciences.co.jp/catalog/pdf/Capto_adhere.pdf

[Documento 7 no de patente] Eriksson K., Ljunglof A., Rodrigo G., Brekkan E., Mab contaminant removal with a multimodal anion exchanger: A platform step to follow Protein A, 2009, BioProcess international 7(2), 52-56.

35 [Documento 8 no de patente] GE Healthcare Capto MMC Date File 11-0035-45AA, <http://www.gelifesciences.co.jp/catalog/pdf/11003545aa.pdf>

[Documento 9 no de patente] BioPharm International mayo, 11, 2011

40 Sinem Özyurt et al. (Journal of Chromatography A (2002), 944 páginas 203-210) describen un método de purificación de antitrombina III por cromatografía de intercambio aniónico con una variedad de amortiguadores diferentes.

Sumario de la invención

45 Problemas que debe resolver la invención

50 Se necesita un método simple para recuperar directamente una proteína objetivo de una composición de proteína y purificar la proteína con una calidad deseada de una manera rápida y eficiente en la producción de proteínas a escala industrial.

Medios para resolver los problemas

55 En el contexto de la presente invención se han realizado esfuerzos para resolver los problemas anteriores. Sorprendentemente, en el contexto de la presente invención se descubrió que la proteína objetivo se puede purificar con una calidad deseada de una manera rápida y eficiente mediante los métodos descritos en las reivindicaciones.

La invención proporciona:

60 [1] Un método para purificar antitrombina, que comprende las etapas de:

(a) adsorber la antitrombina sobre el portador de intercambio aniónico,

65 (b) lavar con un amortiguador que contiene glicina para lavar y eliminar impurezas, y

(c) eluir la antitrombina adsorbida sobre el portador de intercambio aniónico aumentando la concentración de sal o la conductividad del amortiguador, o variando el pH del amortiguador,

5 en el que la antitrombina mantiene una relación de unión de ácido siálico de 70% o más, en el que la relación de unión de ácido siálico representa una relación del número medido de ácidos siálicos unidos al número máximo teórico de ácidos siálicos unidos en la proteína.

10 [2] El método de purificación de acuerdo con [1], en el que se realiza una etapa adicional (d), que es un proceso de recuperación de un intervalo particular de fracciones del eluido para reducir las impurezas hasta el nivel deseado mediante la recuperación del intervalo particular de fracciones después de la elución de la proteína objetivo a partir del portador de intercambio aniónico.

15 [3] El método de purificación de acuerdo con [1] o [2], en el que la recuperación de la antitrombina purificada es 50% o más.

[4] El método de purificación de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], que comprende además la purificación posterior mediante combinaciones de métodos de purificación convencionales, proporcionando de ese modo una composición de antitrombina con una alta pureza para uso farmacéutico.

20 [5] El método de purificación de acuerdo con [4], en el que los métodos de purificación convencionales adicionales incluyen combinaciones de una o más cromatografías que usan cualquier portador o membrana seleccionados de portadores de modo mixto, portadores de intercambio aniónico, portadores de intercambio catiónico, portadores de interacción hidrófoba, portadores de exclusión por tamaño, portadores de filtración en gel, portadores de fase inversa, portadores de hidroxiapatita, portadores de fluorapatita, portadores de celulosa sulfatada, portadores de agarosa sulfatada, y similares, o membranas.

[6] El método de purificación según [5], en el que el portador de modo mixto tiene un grupo de intercambio iónico y un grupo de interacción hidrófoba.

30 [7] El método de purificación de acuerdo con [5] o [6], en el que el portador de modo mixto se selecciona de Capto adhere, Capto MMC, HEA HyperCel, PPA HyperCel, MEP HyperCel, o TOYOPEARL MX-Trp-650M.

Además, se describe en la presente memoria:

35 (1) Un método para purificar una proteína, que comprende un primer proceso cromatográfico que incluye uno o más de los siguientes procesos de (a) a (d):

40 (a) un proceso de puesta en contacto directo de una composición de proteína con un portador de modo mixto;

(b) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de modo mixto, para eliminar las impurezas;

45 (c) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que contiene un aminoácido, para eliminar impurezas;

(d) un proceso para obtener solo una fracción de la proteína purificada con una calidad deseada.

50 (2) El método de purificación descrito en (1), en el que el portador de modo mixto tiene un grupo de intercambio iónico y un grupo de interacción hidrófoba.

(3) El método de purificación descrito en (1) o (2), en el que el portador de modo mixto se selecciona de entre Capto adhere, Capto MMC, HEA HyperCel, PPA HyperCel, MEP HyperCel, o TOYOPEARL MX-Trp-650M.

55 (4) Un método para purificar una proteína, que comprende un primer proceso cromatográfico que incluye uno o más de los siguientes procesos de (a) a (c):

60 (a) un proceso de puesta en contacto de una composición de proteína con un portador de intercambio aniónico;

(b) un proceso de lavado y/o elución del portador de intercambio aniónico usando un amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de intercambio aniónico, para eliminar las impurezas; y

65 (c) un proceso de lavado y/o elución del portador de intercambio aniónico usando un amortiguador que

contiene un aminoácido, para eliminar las impurezas.

- 5
- (5) El método de purificación descrito en uno cualquiera de (1) a (4), en el que una recuperación de la proteína purificada es 50% o más.
- (6) El método de purificación descrito en uno cualquiera de (1) a (5), en el que la proteína es una glicoproteína.
- 10
- (7) El método de purificación descrito en (6), en el que la glicoproteína es una glicoproteína que contiene una cadena de azúcar unida a ácido siálico.
- (8) El método de purificación descrito en (7), en el que la glicoproteína que contiene una cadena de azúcar unida a ácido siálico es antitrombina, proteína S, eritropoyetina, o derivados de las mismas.
- 15
- (9) El método de purificación descrito en (7) u (8), en el que el número de ácidos siálicos unidos de la glicoproteína purificada es 70% o más del número máximo a añadir.
- (10) El método de purificación descrito en uno cualquiera de (1) a (9), que comprende además uno o más procesos cromatográficos después del primer proceso cromatográfico.
- 20
- (11) El método de purificación descrito en uno cualquiera de (1) a (10), en el que el proceso cromatográfico adicional es una cromatografía que usa uno cualquiera de un portador de modo mixto, un portador de intercambio aniónico, una membrana de intercambio aniónico, un portador de intercambio catiónico, una membrana de intercambio catiónico, un portador de interacción hidrófoba, un portador de exclusión por tamaño, un portador de filtración en gel, un portador de fase inversa, un portador de hidroxiapatita, un portador de fluorapatita, un portador de celulosa sulfatada, o un portador de agarosa sulfatada.
- 25
- (12) Una composición que comprende una proteína que se purifica por el método descrito en uno cualquiera de (1) a (11).
- 30
- (13) Un método para purificar antitrombina, que comprende un primer proceso cromatográfico que incluye uno o más de los siguientes procesos de (a) a (d):
- (a) un proceso de puesta en contacto directo de una composición de antitrombina con un portador de modo mixto;
- 35
- (b) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de modo mixto, para eliminar las impurezas;
- (c) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que contiene un aminoácido, para eliminar impurezas;
- 40
- (d) un proceso para obtener solo una fracción de antitrombina con una calidad deseada.
- (14) El método de purificación descrito en (13), en el que el número de ácidos siálicos unidos de la antitrombina purificada es 70% o más del número máximo a añadir.
- 45
- (15) Un método para purificar antitrombina, que comprende un primer proceso cromatográfico que incluye uno o más de los siguientes procesos de (a) a (d):
- (a) un proceso de puesta en contacto de una composición de antitrombina con un portador de intercambio aniónico;
- 50
- (b) un proceso de lavado y/o elución del portador de intercambio aniónico usando un amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de intercambio aniónico, para eliminar las impurezas;
- 55
- (c) un proceso de lavado y/o elución del portador de intercambio aniónico usando un amortiguador que contiene un aminoácido, para eliminar impurezas;
- (d) un proceso para obtener solo una fracción de antitrombina con una calidad deseada.
- 60
- (16) El método de purificación descrito en (15), en el que el número de ácidos siálicos unidos de la antitrombina purificada es 70% o más del número máximo a añadir.
- 65
- (17) Un método para purificar proteína S, que comprende un primer proceso cromatográfico que incluye uno o más de los siguientes procesos de (a) a (d):

- (a) un proceso de puesta en contacto directo de una composición de proteína S con un portador de modo mixto;
- 5 (b) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de modo mixto, para eliminar las impurezas;
- (c) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que contiene un aminoácido, para eliminar impurezas;
- 10 (d) un proceso para obtener solo una fracción de proteína S con una calidad deseada.
- (18) Un método para purificar una proteína, que comprende un primer proceso cromatográfico que incluye los siguientes procesos de (a) a (d):
- 15 (a) un proceso de puesta en contacto directo de una composición de proteína con un portador de modo mixto;
- (b) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de modo mixto, para eliminar las impurezas;
- 20 (c) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que contiene un aminoácido, para eliminar impurezas;
- (d) un proceso para obtener solo una fracción de la proteína purificada con una calidad deseada.
- 25 (19) Un método para purificar una proteína, que comprende un proceso cromatográfico en el que la proteína purificada con una calidad deseada se obtiene en un primer proceso cromatográfico que incluye uno o más de los siguientes procesos de (a) a (d):
- 30 (a) un proceso de puesta en contacto de una composición de proteína con un portador de modo mixto;
- (b) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de modo mixto, para eliminar las impurezas;
- 35 (c) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que contiene un aminoácido, para eliminar impurezas;
- (d) un proceso para obtener solo una fracción de la proteína purificada con una calidad deseada.
- 40 (20) Un método para purificar una proteína, que comprende un primer proceso cromatográfico que incluye dos o más de los siguientes procesos de (a) a (d):
- (a) un proceso de puesta en contacto directo de una composición de proteína con un portador de modo mixto;
- 45 (b) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de modo mixto, para eliminar las impurezas;
- (c) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que contiene un aminoácido, para eliminar impurezas;
- 50 (d) un proceso para obtener solo una fracción de la proteína purificada con una calidad deseada.
- (21) Un método para purificar una proteína, que comprende un primer proceso cromatográfico que incluye tres o más de los siguientes procesos de (a) a (d):
- (a) un proceso de puesta en contacto directo de una composición de proteína con un portador de modo mixto;
- 60 (b) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de modo mixto, para eliminar las impurezas;
- (c) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que contiene un aminoácido, para eliminar impurezas;
- 65

- (d) un proceso para obtener solo una fracción de la proteína purificada con una calidad deseada.
- 5 (22) Un método para purificar una proteína, que comprende un primer proceso cromatográfico que incluye al menos los siguientes procesos de (a) y (b):
- (a) un proceso de puesta en contacto directo de una composición de proteína con un portador de modo mixto;
- 10 (b) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de modo mixto, para eliminar las impurezas;
- (23) Un método para purificar una proteína, que comprende un primer proceso cromatográfico que incluye al menos los siguientes procesos de (a) a (c):
- 15 (a) un proceso de puesta en contacto directo de una composición de proteína con un portador de modo mixto;
- (b) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de modo mixto, para eliminar las impurezas;
- 20 (c) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que contiene un aminoácido, para eliminar impurezas;
- (24) Un método para purificar una proteína, que comprende un primer proceso cromatográfico que incluye los siguientes procesos de (a) a (d):
- 25 (a) un proceso de puesta en contacto directo de una composición de proteína con un portador de intercambio aniónico;
- (b) un proceso de lavado y/o elución del portador de intercambio aniónico usando un amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de intercambio aniónico, para eliminar las impurezas;
- 30 (c) un proceso de lavado y/o elución del portador de intercambio aniónico usando un amortiguador que contiene un aminoácido, para eliminar impurezas;
- 35 (d) un proceso para obtener solo una fracción de la proteína purificada con una calidad deseada.
- (25) Un método para purificar una proteína, que comprende un proceso cromatográfico en el que la proteína purificada con una calidad deseada se obtiene en un primer proceso cromatográfico que incluye los siguientes procesos de (a) a (c):
- 40 (a) un proceso de puesta en contacto directo con una composición de proteína con un portador de intercambio aniónico;
- 45 (b) un proceso de lavado y/o elución del portador de intercambio aniónico usando un amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de intercambio aniónico, para eliminar las impurezas;
- 50 (c) un proceso de lavado y/o elución del portador de intercambio aniónico usando un amortiguador que contiene un aminoácido, para eliminar impurezas;
- (26) El método de purificación descrito en (19) o (25), en donde la calidad deseada es uno o más de los siguientes:
- 55 (a) el número de ácidos siálicos unidos por proteína es 70% o más del número máximo a añadir;
- (b) el contenido de la forma de agregado o escindida es 10% o menos
- (27) Un método para purificar antitrombina, que comprende un primer proceso cromatográfico que incluye al menos los siguientes procesos de (a) a (d):
- 60 (a) un proceso de puesta en contacto directo de una composición de antitrombina con un portador de modo mixto;
- 65 (b) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que debilita la

afinidad de las impurezas por el portador de modo mixto, para eliminar las impurezas;

(c) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que contiene un aminoácido, para eliminar impurezas;

(d) un proceso para obtener solo una fracción de antitrombina con una calidad deseada.

(28) Un método para purificar antitrombina, que comprende un primer proceso cromatográfico que incluye al menos los siguientes procesos de (a) a (d):

(a) un proceso de puesta en contacto de una composición de antitrombina con un portador de intercambio aniónico;

(b) un proceso de lavado y/o elución del portador de intercambio aniónico usando un amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de intercambio aniónico, para eliminar las impurezas;

(c) un proceso de lavado y/o elución del portador de intercambio aniónico usando un amortiguador que contiene un aminoácido, para eliminar impurezas;

(d) un proceso para obtener solo una fracción de antitrombina con una calidad deseada.

(29) Un método para purificar proteína S, que comprende un primer proceso cromatográfico que incluye al menos los siguientes procesos de (a) a (d):

(a) un proceso de puesta en contacto directo de una composición de proteína S con un portador de modo mixto;

(b) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de modo mixto, para eliminar las impurezas;

(c) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que contiene un aminoácido, para eliminar impurezas;

(d) un proceso para obtener solo una fracción de proteína S con una calidad deseada.

Efecto de la invención

La presente divulgación proporciona una técnica para purificar eficientemente la proteína con una calidad deseada (en adelante, denominada en la presente memoria "proteína purificada") mediante la recuperación directa de una proteína objetivo de una composición de proteína, y eliminar eficientemente impurezas relacionadas con la calidad de la propia proteína.

Específicamente, en un método descrito en la presente memoria, una composición de proteína, tal como sobrenadante de cultivo o similar, se aplica directamente a una cromatografía usando un portador de modo mixto, recuperando así de manera eficiente la proteína purificada mientras se mantiene su calidad. Por lo tanto, el tiempo de tratamiento o manipulación antes de la cromatografía se puede reducir, y el deterioro de la calidad de la proteína objetivo asimismo se puede prevenir durante el pretratamiento del sobrenadante del cultivo, tal como concentración o similar.

Además, se describe un método de purificación rápido capaz de eliminar eficazmente las impurezas incluidas en la composición de proteína. Por lo tanto, en comparación con los métodos de purificación convencionales, la calidad y el rendimiento de la proteína pueden mejorarse notablemente.

Más específicamente, se describe un método para preparar productos de purificación de glicoproteínas, tales como antitrombina, eritropoyetina, proteína S, o derivados de los mismos, que tienen el número deseado de ácidos siálicos unidos, el contenido deseado de agregados o fragmentos con un rendimiento aplicable a la preparación práctica.

La proteína preparada por la presente invención es útil como un medicamento.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa el nivel de actividad de neuraminidasa inhibida por la adición de aminoácidos.

La figura 2 representa la cantidad de adsorción de antitrombina por 1 ml de portador.

La figura 3 representa un cromatograma en la purificación del sobrenadante de cultivo de proteína S usando el portador de modo mixto del ejemplo 7, en la que B a E representan las fracciones deseadas de proteína S, y G representa una fracción que contiene principalmente agregados. Un eje vertical representa la absorbancia a UV 280 nm, y un eje horizontal representa el tiempo de elución.

La figura 4 muestra el análisis de transferencia de Western con electroforesis nativa con respecto a la presencia y ausencia de agregados en las fracciones eluidas, en el que A representa el sobrenadante de cultivo añadido, y B a G representan las fracciones eluidas en la purificación usando el portador de modo mixto y corresponden a B a G de la figura 3) La banda más baja y más fuerte representa los monómeros de proteína S.

La figura 5 representa un cromatograma en la purificación del sobrenadante de cultivo de proteína S usando el portador de modo mixto del ejemplo 8, en la que B a E representan picos de elución cuando la purificación se llevó a cabo usando el portador Capto MMC. Un eje vertical representa la absorbancia a UV 280 nm, y un eje horizontal representa el tiempo de elución.

La figura 6 representa un cromatograma en la purificación del sobrenadante de cultivo de proteína S usando el portador en modo hidrófobo del ejemplo 8, en la que F a H representan picos de elución cuando la purificación en columna se llevó a cabo usando el portador Phenyl Sepharose 6 FF (high sub). Un eje vertical representa la absorbancia a UV 280 nm, y un eje horizontal representa el tiempo de elución.

La figura 7 representa el análisis de SDS-PAGE de disoluciones de fracciones en la purificación usando el portador de modo mixto y el portador de modo hidrófobo, en la que A representa el sobrenadante de cultivo cargado en la columna, B a E representan las disoluciones de fracción del cromatograma que se muestra en la figura 5, y F a H representan las disoluciones de fracción del cromatograma que se muestra en la figura 6.

La figura 8 representa los resultados de la electroforesis de enfoque isoeléctrico de la disolución acuosa que contiene proteína S, a la que se añadieron neuraminidasa y aminoácidos, en la que A representa una muestra que se congeló y almacenó inmediatamente después de la adición de agua purificada a la disolución acuosa que contiene proteína S, B representa una muestra que se mantuvo a 37°C durante 3 horas después de la adición de agua purificada a la disolución acuosa que contiene proteína S, C representa una muestra que se mantuvo a 37°C durante 3 horas después de la adición de glicina (concentración final de 1.0 mol/l) y agua purificada a la disolución acuosa que contiene proteína S, D representa una muestra que se mantuvo a 37°C durante 3 horas después de la adición de glicina (concentración final de 1.0 mol/l) y neuraminidasa (concentración final de 0.0005 U/ml) a la disolución acuosa que contiene proteína S, y E representa una muestra que se mantuvo a 37°C durante 3 horas después de la adición de neuraminidasa (concentración final de 0.0005 U/ml) y agua purificada a la disolución acuosa que contiene proteínas. El lado superior del perfil electroforético indica un lado básico, y el lado inferior del mismo indica un lado ácido.

La figura 9 representa los resultados de SDS-PAGE de la disolución acuosa que contiene proteína S, a la que se añadieron aminoácidos y se mantuvo a 25°C durante 6 días, en la que A representa una muestra que se mantuvo a 4°C durante 6 días después de la adición de agua purificada a la disolución acuosa que contiene proteína S, B representa una muestra que se mantuvo a 25°C durante 6 días después de la adición de agua purificada a la disolución acuosa que contiene proteína S, C representa una muestra que se mantuvo a 25°C durante 6 días después de la adición de glicina (concentración final de 0.5 mol/l) a la disolución acuosa que contiene proteína S, y D representa una muestra que se mantuvo a 25°C durante 6 días después de la adición de arginina (concentración final de 0.4 mol/l) a la disolución acuosa que contiene proteína S.

La figura 10 representa los resultados de la electroforesis capilar de eritropoyetina purificada del fluido de cultivo que contiene eritropoyetina, a la que se añadieron aminoácidos y se mantuvo a 25°C durante 7 días. Un eje vertical representa el área del pico, y un eje horizontal representa el número de ácidos siálicos unidos (mol/mol). El círculo negro indica una muestra al inicio de la medida, el cuadrado negro indica una muestra que se añadió con agua purificada y se mantuvo a 25°C durante 7 días, el triángulo negro indica una muestra que se añadió con 1 mol/l de alanina y se mantuvo a 25°C durante 7 días, la cruz indica una muestra que se añadió con 1 mol/l de glicina y se mantuvo a 25°C durante 7 días, y el círculo blanco indica una muestra que se añadió con 1 mol/l de arginina y se mantuvo a 25°C durante 7 días.

La figura 11 representa los resultados del análisis de SDS-PAGE de la proteína S purificada usando el portador de modo mixto y la proteína S purificada sin usar el portador de modo mixto, en la que A representa la proteína S comercial (fabricada por Enzyme Research Laboratories), B representa la proteína S obtenida en el ejemplo 3 Comparativo (purificada sin usar el portador de modo mixto), y C representa la proteína S obtenida en el ejemplo 16 (purificada usando el portador de modo mixto).

La figura 12 representa los resultados del análisis de SDS-PAGE de la proteína S purificada usando el portador de modo mixto y la proteína S purificada sin usar el portador de modo mixto, en la que A representa la proteína S obtenida en el ejemplo 3 Comparativo (purificada sin usar el portador de modo mixto), B representa la proteína

S obtenida en el ejemplo 3 comparativo (purificada sin usar el portador de modo mixto) y mantenida entonces a 37°C durante 3 días, C representa la proteína S obtenida en el ejemplo 16 (purificada usando el portador de modo mixto) y D representa la proteína obtenida en el ejemplo 16 (purificada usando el portador de modo mixto) y mantenida entonces a 37°C durante 3 días.

5

Formas de realización

La invención está definida por las reivindicaciones.

10 La presente divulgación se refiere a un método para purificar una proteína, que incluye un primer proceso cromatográfico que incluye al menos uno de los siguientes procesos de (a) a (d):

(a) un proceso de puesta en contacto directo de una composición de proteína con un portador de modo mixto;

15 (b) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de modo mixto, para eliminar las impurezas;

(c) un proceso de lavado y/o elución del portador de modo mixto usando un amortiguador que contiene aminoácidos, para eliminar impurezas;

20

(d) un proceso para obtener solo una fracción de la proteína purificada con una calidad deseada.

25 La presente divulgación se refiere a un método de purificación para obtener la proteína purificada con la calidad deseada mediante combinaciones apropiadas de puesta en contacto directo una composición de proteína, tal como sobrenadante de cultivo o similar, con el portador de modo mixto, separando o reduciendo rápidamente de la composición de proteína componentes que producen impurezas derivadas de la proteína objetivo o las propias impurezas derivadas de la proteína objetivo, usando un amortiguador que contiene aminoácidos, y seleccionando una fracción de elución.

30 Como se usa en la presente memoria, la expresión "puesta en contacto directo con el portador de modo mixto" significa que no se realiza una dilución múltiple de la composición de la proteína tal como sobrenadante de cultivo o similar, intercambio del amortiguador, intercambio del amortiguador después de la concentración, o dilución después de la concentración.

35 En la presente invención, la composición de proteína puede ser cualquiera, siempre que sea una disolución acuosa que contenga la proteína objetivo. En la presente divulgación, la proteína puede ejemplificarse por proteínas naturales o no naturales que no tienen cadenas de azúcar, glicoproteínas naturales o no naturales, derivados de las mismas, o similares.

40 Ejemplos específicos de las mismas pueden incluir eritropoyetinas, darbepoetinas, antitrombinas (forma α o β , o una mezcla de las mismas), interferones, interleucinas, proteína S, activador del plasminógeno tisular, Factor VII, VIII y IX, trombosmodulinas, glucocerebrosidasa, α -galactosidasa, α -L-iduronidasa, α -glucosidasa ácida, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), trombopoyetina o factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos (MGDF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento similar a insulina, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de la estirpe de células gliales (GDNF), anticuerpos y derivados de los mismos, o similares.

45

La proteína purificada por el método de la invención es la antitrombina.

50

Estas proteínas se preparan a partir de una composición que se obtiene del cuerpo vivo, tal como plasma, orina o similares, un fluido de cultivo de células o bacterias que se obtiene mediante el uso de una técnica de recombinación genética o una técnica de fusión celular, una composición que se obtiene de animales no humanos o plantas transgénicos, o similares, como materia prima de partida.

55

Las células productoras de proteínas pueden ejemplificarse mediante células transgénicas que tienen un gen codificante de proteínas objetivo integrado en ellas. Ejemplos específicos de las mismas pueden incluir estirpes celulares tales como células animales, células vegetales, células de levadura, o similares.

60 Los ejemplos más específicos de las mismas pueden incluir células que se preparan introduciendo el gen de la proteína en células de ovario de hámster chino (célula CHO), células de mieloma de ratón tales como células NS0 o células SP2/0, células de mieloma de rata tales como células YB2/0, células IR983F, células derivadas de riñón de hámster sirio, tales como las células BHK, células de mieloma humano, tales como células de Namalwa, células madre embrionarias, anficetulas, o similares.

65

El medio para cultivar las células productoras de proteínas puede ser cualquiera, siempre que sea adecuado para

cultivar cada célula. El ejemplo del medio para el cultivo de células animales puede incluir un medio basal usado típicamente para el cultivo de células animales. Por ejemplo, se puede usar cualquiera de un medio que contiene suero, un medio que no contiene ningún componente derivado de animales, tal como seroalbúmina o fracción de suero, un medio sin suero, o un medio libre de proteínas, pero se usa preferentemente el medio sin suero o el medio libre de proteínas.

El medio puede ser ejemplificado por medio RPMI1640 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)], medio MEM de Eagle [Science, 122, 501 (1952)], medio MEM modificado de Dulbecco (DMEM) [Virology, 8, 396 (1959)], medio 199 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)], medio F12 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 288 (1965)], medio de Dulbecco modificado de Iscove (medio IMDM) [J. Experimental Medicine, 147, 923 (1978)], medio EX-CELL302, medio EX-CELL-CD-CHO, medio EX-CELL 325 (todos fabricados por SAFC bioscience), medio CD-CHO, medio CD DG44 (todos fabricados por Invitrogen) o medio IS CD-CHO (fabricado por Irvine Scientific), o medios modificados de los mismos, medios mixtos de los mismos, o medios concentrados de los mismos. Entre ellos, se prefiere medio RPMI1640, medio DMEM, medio F12, medio IMDM, medio EX-CELL302, medio CD-CHO, o medio IS CD-CHO.

Si es necesario, asimismo se pueden añadir materiales fisiológicamente activos o factores nutricionales esenciales para el crecimiento de las células productoras de proteínas. Estos aditivos se incluyen en el medio antes del cultivo, o se suministran posteriormente al fluido de cultivo como un medio aditivo o como una disolución aditiva durante el cultivo. El método de suministro puede ser de cualquier forma, tal como una disolución única o una disolución mixta de dos o más, y el método de adición puede ser cualquiera de los métodos continuos e intermitentes.

El animal no humano o planta transgénicos que produce la proteína puede ser un animal no humano o planta que tiene un gen que codifica la proteína que se inserta en la célula. El ejemplo del animal no humano puede incluir ratón, rata, conejillo de indias, hámster, conejo, perro, oveja, cerdo, cabra, ganado vacuno, mono, o similares. El ejemplo de la planta puede incluir hierba india, patata, tomate, zanahoria, soja, brassica, alfalfa, arroz, trigo, cebada, maíz, o similares.

Los ejemplos del método para producir la composición de proteína pueden incluir un método descrito en el documento WO 2008/120801 para una composición de antitrombina, un método descrito en la publicación de patente japonesa NO. H3-198792 para una composición de eritropoyetina, un método descrito en el documento WO 2010/018847 para una composición de proteína S, o similares.

Si los materiales insolubles tales como células o partículas están presentes en la "composición de proteína" así producida, se eliminan de allí, y después de que se eliminan los materiales insolubles, la composición de proteína se aplica al método de purificación de la presente invención. El método para eliminar materiales insolubles tales como células o partículas puede realizarse usando cualquiera seleccionado de centrifugación continua, centrifugación de tipo discontinuo, filtración profunda, microfiltración, carbón activado o similar, o en combinaciones de los mismos. Si es necesario, se ajusta el pH de la composición de proteínas, y después se proporciona para el método de purificación.

En la presente divulgación, no se requiere que la composición de la proteína a poner en contacto con el portador de modo mixto como la primera cromatografía sea tratada previamente, excepto que los materiales insolubles se eliminan de la misma y se ajusta el pH de la misma. Por ejemplo, no es necesario realizar el intercambio de amortiguador mediante filtración de flujo cruzado usando una membrana de ultrafiltración (filtración de flujo tangencial) o diálisis. Además, no es necesario un tratamiento previo tal como la dilución con agua o amortiguador.

En la presente invención, cuando el portador de modo mixto se usa en una etapa adicional del método, se puede realizar un procedimiento distintivo para purificar la proteína objetivo de la composición de proteína, por ejemplo, en este orden: (1) un proceso de puesta en contacto directo la composición de proteína con el portador de modo mixto para adsorber la proteína objetivo al mismo, y (2) un proceso de control de calidad de la proteína objetivo. El proceso de (2) se divide además en (2-1) un proceso de separación de impurezas para eluir la proteína objetivo, y (2-2) un proceso de recuperación de un intervalo particular de fracciones del eluido.

En la presente invención, el portador de modo mixto usado en la cromatografía es preferentemente un portador preparado inmovilizando dos o más tipos de grupos funcionales que tienen diferentes selectividades, preferentemente un grupo de intercambio iónico y un grupo de interacción hidrófoba, en una matriz de fase sólida.

Los ejemplos del grupo de intercambio iónico pueden incluir grupos de intercambio catiónico tales como un grupo sulfato, un grupo sulfato de metilo, un grupo sulfofenilo, un grupo sulfopropilo, un grupo carboximetilo, o similares, o grupos de intercambio aniónico tales como un grupo amonio cuaternario, un grupo aminoetilo cuaternario, un grupo dietilaminoetilo, un grupo dietilaminopropilo, o similares.

Los ejemplos del grupo de interacción hidrófoba pueden incluir un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo isopropilo, un grupo butilo, un grupo terc-butilo, un grupo octilo, un grupo éter, un grupo fenilo, o similares.

En la presente invención, los ejemplos de la matriz de fase sólida pueden incluir polímeros tales como celulosa, sefarosa, agarosa, quitosano, polímeros de ácido acrílico, copolímeros de estireno-divinilbenceno y derivados de los mismos (incluyendo polímeros reticulados), partículas de sílice, partículas de vidrio, partículas cerámicas, partículas los mismos tratadas en la superficie, o similares.

5 El grupo funcional puede inmovilizarse directamente sobre la matriz de fase sólida, o inmovilizarse indirectamente sobre la matriz de fase sólida como un polímero (cadena de injerto) que tiene una pluralidad de grupos funcionales.

10 Los ejemplos específicos del portador de modo mixto pueden incluir Capto adhere, Capto MMC (todos fabricados por GE Healthcare), HEA HyperCel, PPA HyperCel, MEP HyperCel (todos fabricados por Pall Corp.), TOYOPEARL MX-Trp-650M (fabricado por TOSOH Corporation), o similares, pero no se limitan a los mismos.

15 El primer proceso de la presente divulgación, "proceso de puesta en contacto directo de la composición de proteína con el portador de modo mixto para adsorber la proteína objetivo al mismo", se realiza en un modo de captura (modo de adsorción). La composición de proteína descrita anteriormente se aplica a una columna empaquetada con el portador de modo mixto para adsorber la proteína objetivo sobre el portador.

20 La condición para adsorber la proteína en el portador de modo mixto puede ser preferentemente pH 4 a 9, y más preferentemente pH 5 a 8. La cantidad de adsorción de la proteína por 1 ml del portador es preferentemente 1 a 50 mg, y más preferentemente 5 mg o más.

25 La conductividad es preferentemente 0.01 mS/cm a 50 mS/cm, y más preferentemente 0.1 a 20 mS/cm. La cantidad del portador de modo mixto se determina de manera que se adsorbe preferentemente 50% o más, más preferentemente 70% o más, y mucho más preferentemente 80% o más de la proteína objetivo incluida en la composición de proteína, y la proteína se recupera en el rendimiento de proceso de preferentemente 50% o más, más preferentemente 70% o más, y mucho más preferentemente 80% o más.

30 En la primera etapa del segundo proceso de la presente divulgación, "proceso de separación de impurezas y elución de la proteína objetivo", las impurezas se eliminan o se separan a un nivel deseado hasta que la proteína objetivo se eluye del portador de modo mixto. Las primeras impurezas que se eliminarán o separarán pueden incluir componentes que generan las impurezas derivadas de la proteína objetivo, es decir, componentes que cambian las propiedades de la proteína objetivo.

35 Ejemplos específicos de las mismas pueden incluir enzimas glicolíticas, enzimas proteolíticas, oxidorreductasas, o similares. Los ejemplos de las enzimas glicolíticas pueden incluir neuraminidasa (sialidasa), galactosidasa, glicanasa, o similares.

40 Los ejemplos de las enzimas proteolíticas pueden incluir serina proteasa, esterasa, cisteína proteasa, proteasa similar a tripsina, aminopeptidasa, proteasa aspártica, catepsina, o similares.

Los ejemplos de las oxidorreductasas pueden incluir enzimas relacionadas con la tiorredoxina, tales como la tiorredoxina reductasa o similares. El ejemplo del aminoácido isomerasa puede incluir transglutaminasa o similares. Estas impurezas pueden derivarse principalmente de las células hospedantes productoras de la proteína objetivo.

45 Las segundas impurezas que deben eliminarse o separarse son principalmente las derivadas de la proteína objetivo, que se generan por las primeras impurezas descritas anteriormente, y ejemplos de las mismas pueden incluir proteínas modificadas que sufrieron degradación, desnaturalización, eliminación de la cadena de azúcar, oxidación o desamidación, proteínas agregadas, o similares.

50 Este proceso puede realizarse mediante los siguientes procedimientos. La proteína objetivo se adsorbe en el portador de modo mixto, y después se lava con un amortiguador para lavar y eliminar las impurezas. Las condiciones del amortiguador para lavar las impurezas se seleccionan de las condiciones preferidas en las que las impurezas no se adsorben mientras se adsorbe la proteína objetivo, o se reduce la afinidad entre las impurezas y el portador, variando el pH, la conductividad, los ingredientes del amortiguador, la concentración de sal, aditivo o similar. Al seleccionar las condiciones, pueden emplearse diferencias en las propiedades fisicoquímicas entre las impurezas y la proteína objetivo, por ejemplo diferencias en el punto isoeléctrico, carga, hidrofobia, tamaño molecular, conformación, o similares.

60 Estas diferencias pueden ocurrir mediante la eliminación del ácido siálico de la proteína objetivo, cambios en la carga, oxidación, cambios en la hidrofobia o el tamaño molecular por agregación o escisión, desnaturalización dependiendo de las condiciones de la disolución, o similares.

65 Las condiciones específicas del amortiguador usado para el lavado se seleccionan de las condiciones bajo las cuales se generan cambios en la afinidad de las impurezas y la proteína objetivo para el portador de modo mixto, y preferentemente pH 4 a 9, y más preferentemente pH 5 a 8. La conductividad es preferentemente 0.01 a 300 mS/cm, y más preferentemente 0.1 a 250 mS/cm.

Los expertos en la materia pueden seleccionar un pH adecuado en el que se produce una diferencia de afinidad, a partir de combinaciones de grupo de intercambio iónico y grupo de interacción hidrófoba en el portador de modo mixto, pero puede determinarse con referencia a puntos isoeléctricos de la proteína objetivo e impurezas.

Por ejemplo, en el ejemplo 1 descrito a continuación, tanto la antitrombina como la neuraminidasa son proteínas ácidas que tienen puntos isoeléctricos a pH ácido. Sin embargo, debido a que la neuraminidasa tiene un punto isoeléctrico más cercano al pH neutro, su pH al cual el portador de modo mixto que tiene un grupo de intercambio aniónico no se une a la misma es mayor que dicho pH de antitrombina.

Por lo tanto, se puede seleccionar un pH adecuado que genere una diferencia en la afinidad de ambas proteínas examinando la unión de la proteína objetivo y las impurezas mientras se aumenta gradualmente el pH del amortiguador (por ejemplo, cada aumento de 0.2 en el pH) desde la condición ácida (por ejemplo pH 6.0), en el que tanto la neuraminidasa como la antitrombina se adsorben en el portador, a un pH alrededor del punto isoeléctrico de la neuraminidasa.

Además, se puede seleccionar una concentración de sal adecuada que genere una diferencia en la afinidad de ambas proteínas mediante la adición de sal para cambiar la interacción hidrófoba entre la neuraminidasa y el portador de modo mixto en las condiciones de pH respectivas así examinadas, controlando así la conductividad.

Por ejemplo, las condiciones de elución en las que solo se reduce la afinidad de la neuraminidasa por el portador se pueden seleccionar aumentando gradualmente la concentración de sal añadiendo cada 10 mmol/l de cloruro de sodio a un amortiguador de elución en condición ácida (por ejemplo, pH 6.0) en la que tanto la neuraminidasa como la antitrombina se adsorben sobre el portador.

Los procedimientos como se describe anteriormente se realizan para determinar combinaciones óptimas de pH y concentración de sal o conductividad, en las que la neuraminidasa no afecta la calidad de la antitrombina y las condiciones para eliminar la neuraminidasa mediante lavado intermedio.

Los ejemplos del amortiguador usado en este proceso pueden incluir fosfato, citrato, acetato, succinato, maleato, borato, Tris (base), HEPES, MES, PIPES, MOPS, TES, Tricina, o similares.

La concentración de los mismos es preferentemente 0.001 mol/l a 0.5 mol/l, y más preferentemente 0.01 a 0.2 mol/l. Además, la sal puede usarse en una combinación de 0.001 mol/l a 4 mol/l de otra sal tal como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, citrato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de amonio, o similares. Además, el amortiguador de lavado generalmente tiene diferentes ingredientes y condiciones de los del amortiguador usado para adsorber la proteína objetivo sobre el portador en el primer proceso descrito anteriormente.

El amortiguador de lavado usado en el método de la invención es un amortiguador que contiene glicina. Además, el amortiguador usado para la cromatografía o para el lavado puede ser un "amortiguador que contiene aminoácidos". El amortiguador que contiene aminoácidos puede incluir un amortiguador que contiene azúcares, inhibidores enzimáticos, o similares, además de aminoácidos.

Los ejemplos de aminoácidos, azúcares o inhibidores enzimáticos pueden incluir aminoácidos tales como glicina, alanina, arginina, serina, treonina, ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, o similares, y derivados de los mismos, y glucosa, sacarosa, lactosa o ácido siálico, y derivados de los mismos.

Los ejemplos específicos de los mismos pueden incluir 20 mmol/l de fosfato de sodio (pH 6.0) que contiene 300 mmol/l de glicina, 20 mmol/l de fosfato de sodio (pH 6.0) que contiene 100 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de fosfato de sodio (pH 7.0), o similares. La proteína purificada con la calidad deseada se puede obtener usando estos amortiguadores, y estos amortiguadores se pueden aplicar a una variedad de cromatografías, además de la cromatografía en modo mixto.

La proteína objetivo adsorbida sobre el portador de modo mixto se eluye aumentando la concentración de sal o la conductividad del amortiguador, o variando el pH del amortiguador. Durante este procedimiento, la proteína objetivo y las impurezas se separan.

En la presente invención, el "amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de modo mixto" puede ejemplificarse mediante un amortiguador que genera una diferencia de afinidad por el portador entre las impurezas y la proteína objetivo. Un ejemplo específico del mismo puede incluir un amortiguador que tenga un pH y una concentración de sal (o conductividad) adecuados. El pH del amortiguador es preferentemente pH 4 a 9, y más preferentemente pH 5 a 8.

La conductividad del amortiguador es preferentemente 0.01 a 300 mS/cm, y más preferentemente 0.1 a 250 mS/cm. Los expertos en la materia pueden seleccionar un pH adecuado al que se produce una diferencia de

afinidad a partir de combinaciones de grupo de intercambio iónico y grupo de interacción hidrófoba en el portador de modo mixto, asimismo se puede determinar con referencia a puntos isoeléctricos de la proteína objetivo e impurezas

5 Por ejemplo, en el ejemplo 1 descrito a continuación, el pH al que se eluyen la neuraminidasa y la antitrombina por separado se determina aumentando gradualmente el pH desde pH 6.0, en el que tanto la antitrombina como la neuraminidasa se adsorben sobre el portador de modo mixto, hacia el lado básico.

10 Posteriormente, la concentración de sal del amortiguador para elución, a la que se eluyen la neuraminidasa y la antitrombina por separado, se determina, por ejemplo, aumentando gradualmente 10 mmol/l de la concentración de sal en las condiciones de pH respectivas.

15 Además, las condiciones más preferidas para la separación de neuraminidasa y antitrombina se seleccionan de las combinaciones de pH y concentración de sal así examinadas.

20 El método de elución puede ser cualquiera de un método de elución que aplica un amortiguador que tenga una concentración de sal o pH particular al que se reduce la afinidad de la proteína objetivo y el portador de modo mixto (elución de una etapa), un método de elución que varía por etapas la concentración de sal o pH (método por etapas), y un método de elución que varía de forma continua la concentración de sal o pH (método de gradiente).

25 Los ejemplos del amortiguador para elución pueden incluir fosfato, citrato, acetato, succinato, maleato, borato, Tris (base), HEPES, MES, PIPES, MOPS, TES, Tricina, o similares.

30 La concentración de los mismos es preferentemente 0.001 mol/l a 0.5 mol/l, y más preferentemente 0.01 a 0.2 mol/l. Además, la sal puede usarse en una combinación de 0.001 mol/l a 4 mol/l de otra sal tal como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, citrato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de amonio, o similares.

35 Además, el amortiguador puede incluir aminoácidos, azúcares, inhibidores enzimáticos, o similares. Ejemplos de los mismos pueden incluir aminoácidos tales como glicina, alanina, arginina, serina, treonina, ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, o similares, y derivados de los mismos, glucosa, sacarosa, lactosa, ácido siálico, o similares.

40 Los ejemplos específicos de los mismos pueden incluir 5 a 500 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio (pH 4 a 8) que contiene 0 a 1 mol/l de cloruro de sodio, 5 a 500 mmol/l de citrato de sodio (pH 4 a 7) que contiene 0 a 1 mol/l cloruro de sodio, o similares.

45 En la primera etapa del segundo proceso, la proteína objetivo y las impurezas se separan seleccionando cualquiera de los procesos para lavar y eluir la proteína objetivo adsorbida sobre el portador, o mediante combinaciones de ambos procesos.

50 En la presente invención, se puede usar un inhibidor para inhibir la actividad de la neuraminidasa. Los ejemplos del inhibidor pueden incluir ácido siálico, aminoácidos, iones metálicos divalentes, o similares. Los ejemplos de los aminoácidos pueden incluir aminoácidos tales como glicina, alanina, arginina, serina, treonina, ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, o similares, y derivados de los mismos.

55 Estos aminoácidos se usan en el proceso cromatográfico, intermedios durante el proceso de purificación, o un líquido reunido. La concentración de los mismos es preferentemente 0.001 mol/l a 4 mol/l, y más preferentemente 0.1 mol/l a 1 mol/l.

60 Los aminoácidos se añaden al amortiguador de equilibrio, al amortiguador de lavado, o/y a la composición de proteína como material de partida a estas concentraciones, inhibiendo así la eliminación del ácido siálico de la proteína objetivo. Por otra parte, la inhibición de la neuraminidasa mediante la adición de aminoácidos no se limita al proceso de purificación que usa el portador de modo mixto de la presente divulgación, y puede aplicarse a cualquier proceso de producción.

65 La segunda etapa del segundo proceso de la presente divulgación, "proceso de recuperación de un intervalo particular de fracciones del eluido", se realiza para reducir las impurezas hasta el nivel deseado mediante la recuperación del intervalo particular de fracciones después de la elución de la proteína objetivo desde el portador de modo mixto.

Para determinar el intervalo de fracciones, se pueden seleccionar una o más fracciones que contienen la proteína objetivo con la calidad deseada preparando de antemano dos o más fracciones del eluido, y midiendo los contenidos de la proteína objetivo y las impurezas en la fracción respectiva. Mediante este procedimiento, se puede especificar el intervalo de fracciones con la calidad deseada, excluyendo la fracción que contiene una gran cantidad de impurezas.

Al final de la cromatografía del primer proceso, preferentemente 50% o más, más preferentemente 70% o más, y mucho más preferentemente 80% o más de la proteína objetivo se recupera de la composición de proteína, y las impurezas relacionadas con la calidad de la propia proteína se elimina para obtener una disolución de proteína con calidad estable usando la tecnología de la presente invención.

5 La proteína purificada con la "calidad deseada" puede obtenerse usando la tecnología de la presente invención. Por ejemplo, la "calidad deseada" significa que el número de ácidos siálicos unidos por la proteína objetivo es preferentemente 70% o más, y más preferentemente 80% o más del número máximo a añadir.

10 Por ejemplo, la "calidad deseada" asimismo significa que el contenido de la forma de agregado o escindida se reduce hasta preferentemente 10% o menos, más preferentemente 5% o menos, y mucho más preferentemente 1% o menos.

15 Específicamente, la proteína purificada con la calidad deseada puede incluir la forma α de antitrombina que tiene 6 mol/mol o más del número de ácidos siálicos unidos por 1 molécula, la forma β de antitrombina que tiene 4 mol/mol o más del número de ácidos siálicos unidos por 1 molécula, una mezcla de las formas α y β de antitrombina, eritropoyetina que tiene 8 mol/mol o más del número de ácidos siálicos unidos por 1 molécula, proteína S que tiene 5 mol/mol o más del número de ácidos siálicos unidos por 1 molécula, antitrombina que tiene el contenido de agregado de 1% o menos, eritropoyetina que tiene el contenido de agregado de 1% o menos, proteína S que tiene el contenido de agregado de 10% o menos, proteína S que tiene el contenido de forma escindida de 10% o menos, o similares.

20 La presente divulgación se refiere a un método para purificar una proteína, que incluye un primer proceso cromatográfico que incluye los siguientes procesos de (a) a (c):

- 25 (a) un proceso de puesta en contacto de una composición de proteína con un portador de intercambio aniónico;
- (b) un proceso de lavado y/o elución del portador de intercambio aniónico usando un amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de intercambio aniónico, para eliminar las impurezas; y
- 30 (c) un proceso de lavado y/o elución del portador de intercambio aniónico usando un amortiguador que contiene aminoácidos, para eliminar impurezas.

35 A los procesos de (a) a (c), (d), se les puede añadir un proceso para obtener solo una fracción de la proteína purificada con la calidad deseada.

40 Además, la presente divulgación se refiere a un método de purificación para obtener la proteína purificada con la calidad deseada mediante combinaciones apropiadas de puesta en contacto de la composición de proteína, tal como sobrenadante de cultivo o similar, con el portador de intercambio aniónico, separando o reduciendo rápidamente de la composición de proteína componentes que producen impurezas derivadas de la proteína objetivo o las propias impurezas derivadas de la proteínas objetivo, usando un amortiguador que contiene aminoácidos, y seleccionando una fracción de elución.

45 En la presente invención, cuando se usa el portador de intercambio aniónico, se puede realizar un procedimiento distintivo según se reivindica para purificar la proteína objetivo de la composición de proteína, por ejemplo, en este orden: (1) un proceso de puesta en contacto de la composición de proteína con el portador de intercambio aniónico para adsorber la proteína objetivo al mismo, y (2) un proceso de control de calidad de la proteína objetivo. El proceso de (2) se divide además en (2-1) un proceso de separación de impurezas para eluir la proteína objetivo, y (2-2) un proceso de recuperación de un intervalo particular de fracciones del eluido.

50 En la presente invención, el portador de intercambio aniónico usado en el primer proceso de cromatografía puede ser un portador o membrana preparado inmovilizando directa o indirectamente grupos de intercambio aniónico sobre una matriz de fase sólida. El grupo de intercambio aniónico, la matriz de fase sólida, y la inmovilización de los grupos de intercambio aniónico sobre la matriz de fase sólida son los mismos que los descritos anteriormente.

55 Los ejemplos específicos de los mismos pueden incluir Q Sepharose XL, Q Sepharose FF, DEAE Sepharose FF, ANX Sepharose FF, Capto Q, Capto DEAE, Capto Q ImpRes (todos fabricados por GE Healthcare), TOYOPEARL GigaCap Q-650, TOYOPEARL SuperQ-650 (todos fabricados por TOSOH Corporation), Fractogel DEAE, Fractogel TMAE, Fractogel TMAE Hicap, Eshmuno Q (todos fabricados por Merck), Cellufine MAX-Q (fabricado por JNC), o similares, pero no se limitan a los mismos.

60 El primer proceso de la presente invención, "proceso de puesta en contacto de la composición de proteína con el portador de intercambio aniónico para adsorber la proteína objetivo al mismo", se realiza en un modo de captura (modo de adsorción). La composición de proteína descrita anteriormente se aplica a una columna empaquetada con el portador de intercambio aniónico para adsorber la proteína objetivo sobre el portador.

65

La condición para adsorber la proteína sobre el portador de intercambio aniónico puede ser preferentemente pH 4 a 9, y más preferentemente pH 5 a 8. La cantidad de adsorción de la proteína por 1 ml del portador es preferentemente 1 a 100 mg, y más preferentemente 5 mg o más.

5 La conductividad es preferentemente 0.01 mS/cm a 50 mS/cm, y más preferentemente 0.1 a 30 mS/cm. La cantidad del portador de intercambio aniónico se determina de manera que se adsorbe preferentemente 50% o más, más preferentemente 70% o más, y mucho más preferentemente 80% o más de la proteína objetivo incluida en la composición de proteína, y la proteína se recupera en el rendimiento del proceso de preferentemente 50% o más, más preferentemente 70% o más, y mucho más preferentemente 80% o más.

10 En la primera etapa del segundo proceso de la presente invención, "proceso de separación de impurezas y elución de la proteína objetivo", las impurezas se eliminan o se separan a un nivel deseado hasta que la proteína objetivo se eluye del portador de intercambio aniónico.

15 Las primeras impurezas que se eliminan o separan pueden incluir componentes que generan las impurezas derivadas de la proteína objetivo, es decir, componentes que cambian las propiedades de la proteína objetivo, como se describe anteriormente. Las segundas impurezas que se deben eliminar o separar son principalmente las derivadas de la proteína objetivo, que se generan por las primeras impurezas descritas anteriormente.

20 Este proceso puede realizarse mediante los siguientes procedimientos. La proteína objetivo se adsorbe sobre el portador de intercambio aniónico y después se lava con un amortiguador para lavar y eliminar las impurezas. Las condiciones del amortiguador para lavar las impurezas se seleccionan de las condiciones en las que las impurezas no se adsorben mientras se adsorbe la proteína objetivo, o se reduce la afinidad entre las impurezas y el portador, variando el pH, la conductividad, los ingredientes del amortiguador, la concentración de sal, el aditivo, o similar.

25 En la selección de las condiciones, pueden emplearse diferencias en las propiedades fisicoquímicas entre las impurezas y la proteína objetivo, por ejemplo diferencias en el punto isoeléctrico, carga, hidrofobia, tamaño molecular, conformación, o similares. Estas diferencias pueden ocurrir mediante la eliminación del ácido siálico de la proteína objetivo, cambios en la carga, oxidación, cambios en la hidrofobia o el tamaño molecular por agregación o escisión, desnaturalización dependiendo de las condiciones de la disolución, o similares.

30 Las condiciones específicas del amortiguador usado para el lavado se seleccionan de las condiciones bajo las cuales se generan cambios en la afinidad de las impurezas y la proteína objetivo para el portador de intercambio aniónico, preferentemente pH 4 a 9, y más preferentemente pH 5 a 8.

35 La conductividad es preferentemente 0.01 a 300 mS/cm, y más preferentemente 0.1 a 250 mS/cm. Los expertos en la materia pueden seleccionar un pH adecuado al que se produce una diferencia en la afinidad, a partir de los grupos de intercambio aniónico en el portador de intercambio aniónico, pero asimismo se puede determinar con referencia a puntos isoeléctricos de la proteína objetivo y las impurezas como se describió anteriormente.

40 Los ejemplos del amortiguador usado en este proceso pueden incluir fosfato, citrato, acetato, succinato, maleato, borato, Tris (base), HEPES, MES, PIPES, MOPS, TES, Tricina, o similares.

45 La concentración de los mismos es preferentemente 0.001 mol/l a 0.5 mol/l, y más preferentemente 0.01 a 0.1 mol/l. Además, la sal mencionada anteriormente puede usarse en una combinación de 0.001 mol/l a 4 mol/l de otra sal tal como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, citrato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de amonio, o similares. Además, el amortiguador de lavado generalmente tiene diferentes ingredientes y condiciones de los del amortiguador usado para adsorber la proteína objetivo sobre el portador en el primer proceso descrito anteriormente.

50 Además, el amortiguador usado para la cromatografía o para el lavado puede ser un "amortiguador que contiene aminoácidos". El amortiguador que contiene aminoácidos puede incluir un amortiguador que contiene azúcares, inhibidores enzimáticos, o similares, además de aminoácidos.

55 Los ejemplos de los aminoácidos pueden incluir aminoácidos tales como glicina, alanina, arginina, serina, treonina, ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, o similares, y derivados de los mismos, y los ejemplos de los azúcares pueden incluir glucosa, sacarosa, lactosa o ácido siálico, y derivados de los mismos como se describe anteriormente. Estos amortiguadores pueden usarse para obtener la proteína purificada con la calidad deseada, y aplicarse a una variedad de cromatografías.

60 La proteína objetivo adsorbida sobre el portador de intercambio aniónico se eluye aumentando la concentración de sal o la conductividad del amortiguador, o variando el pH del amortiguador. Durante este procedimiento, la proteína objetivo y las impurezas se separan.

65 En la presente invención, el "amortiguador que debilita la afinidad de las impurezas por el portador de intercambio aniónico" puede ejemplificarse mediante un amortiguador que genera una diferencia en la afinidad por el portador

entre las impurezas y la proteína objetivo. Un ejemplo específico del mismo puede incluir un amortiguador que tenga un pH y una concentración de sal (o conductividad) adecuados.

5 El pH del amortiguador correspondiente es preferentemente pH 4 a 9, y más preferentemente pH 5 a 8. La conductividad del amortiguador es preferentemente 0.01 a 300 mS/cm, y más preferentemente 0.1 a 250 mS/cm.

10 Los expertos en la materia pueden seleccionar un pH adecuado al que se produce una diferencia en la afinidad, a partir de los grupos de intercambio aniónico en el portador de intercambio aniónico, pero asimismo se puede determinar con referencia a los puntos isoeléctricos de la proteína objetivo y las impurezas como se describió anteriormente.

15 El método de elución puede ser cualquiera de un método de elución que aplica un amortiguador que tenga una concentración de sal o pH particular al que se reduce la afinidad de la proteína objetivo y el portador de intercambio aniónico (elución de una etapa), un método de elución que varía por etapas la concentración de sal o pH (método por etapas), y un método de elución que varía de forma continua la concentración de sal o pH (método de gradiente).

20 Los ejemplos del amortiguador para elución pueden incluir fosfato, citrato, acetato, succinato, maleato, borato, Tris (base), HEPES, MES, PIPES, MOPS, TES, Tricina, o similares.

25 La concentración de los mismos es preferentemente 0.001 mol/l a 0.5 mol/l, y más preferentemente 0.01 a 0.1 mol/l. Además, la sal mencionada anteriormente puede usarse en una combinación de 0.001 mol/l a 4 mol/l de otra sal tal como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, citrato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de amonio, o similares.

30 Además, el amortiguador puede incluir aminoácidos, azúcares, inhibidores enzimáticos, o similares. Los ejemplos de los mismos pueden incluir aminoácidos tales como glicina, alanina, arginina, serina, treonina, ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, o similares, y derivados de los mismos, y glucosa, sacarosa, lactosa, ácido siálico, o similares.

35 Los ejemplos específicos de los mismos pueden incluir 5 a 500 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio (pH 4 a 8) que contiene 0 a 1 mol/l de cloruro de sodio, 5 a 500 mmol/l de citrato de sodio (pH 4 a 7) que contiene 0 a 1 mol/l cloruro de sodio, o similares.

40 En la primera etapa del segundo proceso, la proteína objetivo y las impurezas se separan seleccionando cualquiera de los procesos para lavar y eluir la proteína objetivo adsorbida sobre el portador, o mediante combinaciones de ambos procesos.

45 En la presente invención, se puede usar un inhibidor para inhibir la actividad de la neuraminidasa. Los ejemplos del inhibidor pueden incluir ácido siálico, aminoácidos, iones metálicos divalentes, y similares. Los ejemplos de los aminoácidos pueden incluir aminoácidos tales como glicina, alanina, arginina, serina, treonina, ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, o similares, y derivados de los mismos.

50 Estos aminoácidos se usan en el proceso cromatográfico, intermedios durante el proceso de purificación, o un líquido reunido. La concentración de los mismos es preferentemente 0.001 mol/l a 4 mol/l, y más preferentemente 0.1 mol/l a 1 mol/l.

55 Los aminoácidos se añaden al amortiguador de equilibrio, al amortiguador de lavado, o/y a la composición de proteína como material de partida a estas concentraciones, inhibiendo así la eliminación del ácido siálico de la proteína objetivo. Por otra parte, la inhibición de la neuraminidasa mediante la adición de aminoácidos no se limita al proceso de purificación que usa el portador de intercambio aniónico de la presente invención, y puede aplicarse a cualquier proceso de producción.

60 La segunda etapa del segundo proceso de la presente invención, "proceso de recuperación de un intervalo particular de fracciones del eluido", se realiza para reducir las impurezas hasta el nivel deseado mediante la recuperación del intervalo particular de fracciones después de la elución de la proteína objetivo del portador de intercambio aniónico.

65 Para determinar el intervalo de fracciones, se pueden seleccionar una o más fracciones que contienen la proteína objetivo con la calidad deseada preparando de antemano dos o más fracciones del eluido, y midiendo los contenidos de la proteína objetivo y las impurezas en la fracción respectiva. Mediante este procedimiento, se puede especificar el intervalo de fracciones con la calidad deseada, excluyendo la fracción que contiene una gran cantidad de impurezas.

Al final de la cromatografía del primer proceso, preferentemente 50% o más, más preferentemente 70% o más, y mucho más preferentemente 80% o más de la proteína objetivo se recupera de la composición de proteína, y las

impurezas relacionadas con la calidad de la propia proteína se eliminan para obtener una disolución de proteína con calidad estable usando la tecnología de la presente invención. La proteína purificada con la “calidad deseada” puede obtenerse usando la tecnología de la presente invención, como se describe anteriormente.

5 En la presente invención, la composición de proteína se purifica usando el portador de intercambio aniónico en el primer proceso cromatográfico, y posteriormente se purifica mediante combinaciones de los métodos de purificación convencionales, proporcionando de ese modo una composición de proteína con una alta pureza para uso farmacéutico.

10 Los ejemplos de los métodos de purificación convencionales pueden incluir combinaciones de una o más cromatografías usando cualquier portador o membrana seleccionada de portadores de modo mixto, portadores de intercambio aniónico, portadores de intercambio catiónico, portadores de interacción hidrófoba, portadores de exclusión por tamaño, portadores de filtración en gel, portadores de fase inversa, portadores de hidroxapatita, portadores de fluorapatita, portadores de celulosa sulfatada, portadores de agarosa sulfatada, y similares, o
15 membranas. Además, pueden aplicarse adecuadamente manipulaciones unitarias tales como intercambio de amortiguador, concentración, dilución, filtración, inactivación de virus, eliminación de virus, o similares.

Los ejemplos del portador de modo mixto pueden incluir los portadores de modo mixto descritos anteriormente. Los ejemplos específicos de los mismos pueden incluir Capto adhere, Capto MMC (todos fabricados por GE Healthcare), HEA HyperCel, PPA HyperCel, MEP HyperCel (todos fabricados por Pall Corp.), TOYOPEARL MX-Trp-650M (fabricado por TOSOH Corporation), o similares, pero no se limitan a los mismos.

Los ejemplos del portador de intercambio aniónico pueden incluir un portador o membrana preparado inmovilizando directa o indirectamente grupos de intercambio aniónico sobre una matriz de fase sólida. El grupo de intercambio
25 aniónico, la matriz de fase sólida, y la inmovilización de los grupos de intercambio aniónico sobre la matriz de fase sólida son los mismos que los descritos anteriormente.

Los ejemplos específicos de los mismos pueden incluir Q Sepharose XL, Q Sepharose FF, DEAE Sepharose FF, ANX Sepharose FF, Capto Q, Capto DEAE, Capto Q ImpRes (todos fabricados por GE Healthcare), TOYOPEARL GigaCap Q-650, TOYOPEARL SuperQ-650 (todos fabricados por TOSOH Corporation), Fractogel DEAE, Fractogel TMAE, Fractogel TMAE Hicap, Eshmuno Q (todos fabricados por Merck), Cellufine MAX-Q (fabricado por JNC) Mustang Q (fabricado por Pall), Sartobind Q, Sartobind STIC (todos fabricados por Sartorius), o similares, pero no se limitan a los mismos.

Los ejemplos del portador de intercambio catiónico pueden incluir un portador o membrana preparado inmovilizando directa o indirectamente grupos de intercambio catiónico sobre una matriz de fase sólida. El grupo de intercambio catiónico, la matriz de fase sólida, y la inmovilización de los grupos de intercambio catiónico sobre la matriz de fase sólida son los mismos que los descritos anteriormente.

Los ejemplos específicos de los mismos pueden incluir SP Sepharose FF, CM Sepharose FF, SP Sepharose XL, Capto S (todos fabricados por GE Healthcare), Poros 50 HS, Poros 50 XS (todos fabricados por Applied Biosystems), Eshmuno S, Fractogel COO-, Fractogel SO3-, Fractogel SE Hicap (todos fabricados por Merck), TOYOPEARL GigaCap S-650, TOYOPEARL GigaCap CM-650 (todos fabricados por TOSOH Corporation), Cellufine MAX-S (fabricado por JNC), Mustang S (fabricado por Pall), Sartobind S (fabricado por Sartorius), o
45 similares, pero no se limitan a los mismos.

Los ejemplos del portador de interacción hidrófoba pueden incluir un portador preparado inmovilizando directa o indirectamente grupos de interacción hidrófoba sobre una matriz de fase sólida. El grupo de interacción hidrófoba, la matriz de fase sólida, y la inmovilización de los grupos de interacción hidrófoba sobre la matriz en fase sólida son los mismos que se describen anteriormente.

Los ejemplos específicos de los mismos pueden incluir Phenyl Sepharose, Butyl Sepharose, Octyl Sepharose (todos fabricados por GE Healthcare), TOYOPEARL SUPER BUTYL-550C, TOYOPEARL BUTYL-650C, TOYOPEARL BUTYL-600M, TOYOPEARL PHENYL-650, TOYOPEARL PPG-600M, TOYOPEARL Ether-650M, TOYOPEARL Hexyl-650C, TSKgel Phenyl-5PW (todos fabricados por TOSOH Corporation), serie de portadores Macroprep HIC (fabricada por Bio-Rad), Cellufine Phenyl, Cellufine Butyl (todos fabricados por JNC), Butylated Chitopearl, Phenylated Chitopearl (todos fabricados por HUIBO Holdings, inc.) o similares, pero no se limitan a los mismos.

Los ejemplos del portador para la cromatografía de fase inversa pueden incluir un portador preparado inmovilizando directa o indirectamente grupos hidrocarbonados sobre una matriz de fase sólida. Los ejemplos de los grupos hidrocarbonados pueden incluir grupos trimetilo, grupos butilo, grupos fenilo, grupos octilo, o grupos octadecilo, y grupos funcionales de los mismos modificados en los extremos.

La matriz de fase sólida y la inmovilización de los grupos de interacción hidrófoba sobre la matriz de fase sólida son las mismas que se describieron anteriormente. Los ejemplos específicos de las mismas pueden incluir la serie

RESOURCE RPC, la serie SOURCE RPC (todas fabricadas por GE Healthcare) o similares, pero no están limitadas a las mismas.

5 Los ejemplos del portador de exclusión por tamaño o el portador de filtración en gel pueden incluir portadores que están compuestos de polímeros que consisten en dextrano, alil dextrano, N,N'-metilbisacrilamida, celulosa, agarosa, estireno, divinilbenceno, alcohol polivinílico, sílice, quitosano, o similares.

10 Los ejemplos específicos de los mismos pueden incluir la serie Sephacryl S, la serie Sepharose, la serie Sephadex, la serie Superdex, la serie Sephacryl (todas fabricadas por GE Healthcare), la serie TOYOPEARL HW, la serie TSKgel PW (todas fabricadas por TOSOH Corporation), Bio gel Agarose, Bio gel P Polyacrylamide (todos fabricados por Bio-Rad), Cellufine GH, Cellufine GCL (todos fabricados por JNC), Trisacryl GF05, Trisacryl GF2000, Ultrogel AcA (todos fabricados por Pall Corp.), Fractogel BioSEC (fabricado por Merck), o similares, pero no están limitados a los mismos.

15 Los ejemplos del portador de hidroxiapatita pueden incluir CHT Ceramic Hydroxyapatite Type I o Type II (todos fabricados por Bio-Rad), pero no se limitan a los mismos. Además, los ejemplos del portador de fluoroapatita pueden incluir CFT Ceramic Fluoroapatite (fabricado por Bio-Rad), o similares, pero no se limitan a los mismos.

20 Los ejemplos de los portadores de celulosa sulfatada o los portadores de sulfato de agarosa pueden incluir Cellufine Sulfate, Cellufine Sulfate m, Cellufine Sulfate c, Sulfated Cellulofine m, Sulfated Cellulofine c, Sulfated Cellufine m, Sulfated Cellufine c (todos fabricados por JNC), Capto DeVirS (fabricado por GE Healthcare), o similares, pero no se limitan a los mismos.

25 En los métodos de purificación convencionales, la cromatografía que usa el portador o la membrana puede realizarse en un modo de captura (modo de adsorción) o en un modo de flujo (modo de no adsorción), dependiendo del fin. El amortiguador usado en la cromatografía o el lavado se selecciona variando el pH, la conductividad, los ingredientes del amortiguador, la concentración de sal, el aditivo, o similares, para que sean condiciones preferibles.

30 En la selección de las condiciones, pueden emplearse diferencias en las propiedades fisicoquímicas entre las impurezas y la proteína objetivo, por ejemplo diferencias en el punto isoeléctrico, carga, hidrofobia, tamaño molecular o conformación, o similares. El método de elución del modo de captura puede ser cualquiera de un método de elución que aplica un amortiguador que tiene una concentración de sal o pH particular a la cual se reduce la afinidad de la proteína objetivo y el portador (elución de una etapa), un método de elución que varía por etapas la concentración de sal o pH (método por etapas), y un método de elución que varía continuamente la concentración de sal o pH (método de gradiente).

35 La proteína objetivo con la calidad demandada como productos farmacéuticos se puede obtener mediante combinaciones de los procesos mencionados anteriormente.

40 Por ejemplo, la antitrombina, la eritropoyetina, la proteína S, o derivados de las mismas, que mantienen la relación de unión del ácido siálico de 70% o más, y preferentemente 80% o más, se pueden obtener con una pureza suficiente para uso farmacéutico. Además, se puede obtener la antitrombina, la eritropoyetina, la proteína S, o derivados de las mismas, que tiene un contenido reducido de forma de agregado o forma escindida de 10% o menos, preferentemente 5% o menos, y más preferentemente 1% o menos.

45 En la presente invención, el número de ácidos siálicos unidos es el número promedio de moléculas de ácidos siálicos (mol/mol) que se unen a 1 molécula de la proteína. Específicamente, se puede medir mediante, por ejemplo, una HPLC fluorescente [Anal. Biochem., 164, 138(1987)], un método de resorcinol, o similar. El número de ácidos siálicos unidos asimismo se puede medir mediante, por ejemplo, electroforesis de enfoque isoeléctrico, electroforesis de enfoque isoeléctrico capilar, o similares.

50 La relación de unión del ácido siálico representa una relación del número medido de ácidos siálicos unidos al número teórico máximo de ácidos siálicos unidos (el número máximo a añadir) en la proteína. El número máximo teórico de ácidos siálicos unidos es, por ejemplo, 8 mol/mol para la forma α de antitrombina, 6 mol/mol para la forma β de antitrombina, 14 mol/mol para la eritropoyetina, y 6 mol/mol para la proteína S.

55 En la presente invención, el contenido de la forma de agregado y forma escindida en antitrombina asimismo se puede medir mediante un método de HPLC de filtración en gel, electroforesis en gel de poliacrilamida, dispersión de luz, un método de ultracentrifugación, o similares.

60 Con respecto al uso de la presente invención, la proteína podría usarse como ingrediente principal en productos farmacéuticos, agentes de diagnóstico, alimentos, productos de la industria química, o similares.

65 La presente divulgación se refiere a una composición que incluye la proteína que se purifica mediante el método de purificación de proteínas descrito anteriormente.

En la presente divulgación, los ejemplos de la composición que incluye la proteína purificada pueden incluir formulaciones de fármacos.

5 Es posible administrar las formulaciones de fármacos de la presente divulgación, que incluyen la proteína purificada sola, como agente profiláctico o terapéutico. Sin embargo, la formulación del fármaco se proporciona preferentemente como una formulación que se prepara mezclando con uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables típicos o similares mediante cualquier método bien conocido en el campo técnico de la farmacia.

10 Los ejemplos de las formulaciones pueden incluir pulverización, cápsula, comprimido, gránulo, jarabe, emulsión, supositorio, formulación inyectable, pomada, cinta, o similares.

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden incluir emulsión, jarabe, cápsula, comprimido, polvo, gránulo, o similares.

15 Las formulaciones líquidas, tales como emulsión y jarabe, pueden prepararse usando agua, un sacárido tal como sacarosa, sorbitol y fructosa, glicol tal como polietilenglicol y propilenglicol, aceite tal como aceite de sésamo, aceite de oliva y aceite de soja, un antiséptico tal como ésteres de p-hidroxibenzoato, o un sabor tal como sabor a fresa y menta.

20 La cápsula, el comprimido, el polvo o los gránulos se pueden producir usando un excipiente tal como lactosa, glucosa, sacarosa y manitol, un disgregante tal como almidón y alginato de sodio, un lubricante tal como estearato de magnesio y talco, un aglutinante tal como alcohol polivinílico, hidroxipropilcelulosa y gelatina, un tensioactivo tal como un éster de ácido graso, un plastificante tal como glicerina, o similares.

25 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral pueden ejemplificarse mediante formulaciones inyectables, supositorios, pulverización, y similares.

30 Las formulaciones inyectables se preparan usando un aditivo compuesto de una disolución salina o una disolución de glucosa, o una mezcla de las mismas. Alternativamente, la proteína purificada se liofiliza según el método típico, y se le añade cloruro de sodio, preparando así una formulación inyectable de polvo.

Los supositorios se preparan usando aditivos tales como manteca de cacao, grasa hidrogenada, ácidos carboxílicos, o similares.

35 Además, las formulaciones de pulverización se preparan usando la propia proteína purificada, o usando un portador que dispersa la proteína purificada como micropartículas para una fácil absorción sin irritar la cavidad oral y la membrana mucosa orofaríngea de un receptor.

40 Los ejemplos específicos del aditivo pueden incluir lactosa, glicerina, o similares. Las formulaciones tales como aerosol o polvo seco son posibles dependiendo de las propiedades de la proteína purificada y el portador a usar. Los ingredientes ejemplificados como el aditivo para formulaciones orales asimismo se pueden añadir a las formulaciones parenterales.

45 La presente divulgación se refiere a un método para purificar antitrombina con la calidad deseada mediante combinaciones apropiadas de puesta en contacto directo de una composición de antitrombina, tal como sobrenadante de cultivo o similar, con el portador de modo mixto o el portador de intercambio aniónico, separando o reduciendo rápidamente de la composición de antitrombina componentes que produzcan impurezas o las propias impurezas, usando un amortiguador que contenga aminoácidos, y seleccionando una fracción de elución.

50 La composición de antitrombina tal como sobrenadante de cultivo o similar se puede obtener, por ejemplo, mediante el método descrito en el documento WO 2008/120801.

55 El portador usado en el portador de modo mixto o portador de intercambio aniónico en el primer proceso cromatográfico, y el método de purificación del primer proceso cromatográfico, son los mismos que los descritos anteriormente.

60 La composición de antitrombina se purifica usando el portador de intercambio aniónico en el primer proceso cromatográfico, y posteriormente se purifica mediante combinaciones de los métodos de purificación convencionales, proporcionando de ese modo antitrombina con una alta pureza para uso farmacéutico.

El método de purificación convencional puede ser preferentemente un método de purificación que incluye al menos uno de portador de intercambio aniónico, membrana de intercambio aniónico, portador de celulosa sulfatada, portador de agarosa sulfatada, o portador de interacción hidrófoba, como se describió anteriormente.

65 El ejemplo del mismo puede incluir un método de purificación para obtener antitrombina purificada usando el

portador de intercambio aniónico o la membrana de intercambio aniónico en el segundo proceso cromatográfico, el portador de celulosa sulfatada o el portador de agarosa sulfatada en el tercer proceso cromatográfico, y el portador de interacción hidrófoba en el cuarto proceso cromatográfico.

5 El número de ácidos siálicos unidos de la antitrombina purificada así obtenida por el método de purificación anterior es 70% o más del número máximo a añadir.

10 La presente divulgación se refiere a un método para purificar proteína S con la calidad deseada mediante combinaciones apropiadas de puesta en contacto directo de una composición de proteína S tal como sobrenadante de cultivo o similar con el portador de modo mixto, separando o reduciendo rápidamente componentes que producen impurezas de la composición de proteína S o las propias impurezas, usando un amortiguador que contiene aminoácidos, y seleccionando una fracción de elución.

15 La composición de proteína S tal como sobrenadante de cultivo o similar se puede obtener, por ejemplo, mediante el método descrito en el documento WO 2010/018847.

El portador usado en el portador de modo mixto en el primer proceso cromatográfico, y el método de purificación del primer proceso cromatográfico son los mismos que los descritos anteriormente.

20 La composición de proteína S se purifica usando el portador de modo mixto en el primer proceso cromatográfico, y posteriormente se purifica mediante combinaciones de los métodos de purificación convencionales, proporcionando de ese modo la proteína S con una alta pureza para uso farmacéutico. El método de purificación convencional puede ser preferentemente un método de purificación que usa al menos uno de un portador de intercambio aniónico, una membrana de intercambio aniónico, o un portador de hidroxiapatita, como se describió anteriormente.

25 El ejemplo del mismo puede incluir un método de purificación para obtener la proteína S purificada que incluye el portador de intercambio aniónico en el segundo proceso cromatográfico, y el portador de hidroxiapatita en el tercer proceso cromatográfico.

30 **Ejemplos**

En adelante, la presente invención se describirá con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos.

35 **[Ejemplo 1] (no es un método de la invención) Ejemplo de un método para eliminar sialidasa de un sobrenadante de cultivo de antitrombina usando un portador de modo mixto para recuperar un objeto**

40 Se hizo pasar directamente un sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene aproximadamente 380 mg de antitrombina a través de una columna de modo mixto (fabricada por GE Healthcare, Capto adhere, volumen de columna: 38 ml) equilibrada con amortiguador AA (100 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.0) para adsorber la antitrombina a la misma.

45 La columna se lavó con 195 ml de amortiguador AA (100 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.0), y después se aplicaron 152 ml de amortiguador AB (350 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0) para eluir la antitrombina.

50 La concentración de antitrombina y la actividad de neuraminidasa en la fracción de lavado antes de la elución y en un intervalo particular de eluido se midieron mediante el método de HPLC de fase inversa [J. Chromatography B, 662, 209 (1994)] y el ensayo enzimático [Glycobiology, 3, 455 (1993)], respectivamente. Los resultados se muestran en la tabla 1.

[Tabla 1]

Separación de antitrombina y neuraminidasa mediante cromatografía de modo mixto del ejemplo 1		
	Concentración de antitrombina (g/l)	Actividad de neuraminidasa (U/l)
Fracción de lavado antes de la elución	No detectada	28.4
Eluido	2.80	No detectada

55 Como se muestra en la tabla 1, la recuperación de antitrombina en el eluido predeterminado fue tan buena como 84%. La neuraminidasa se eluyó en la fracción de lavado antes de la elución, y la antitrombina se eluyó en el eluido.

60 En las condiciones del ejemplo 1 comparativo, la actividad de neuraminidasa asimismo se detectó en el eluido de antitrombina. Sin embargo, se descubrió que la condición del amortiguador usado para el lavado antes de la elución se controló a un pH que debilita la afinidad de la neuraminidasa por el portador de modo mixto, separando así

directamente de una manera muy eficaz la antitrombina y la neuraminidasa del sobrenadante del cultivo mediante la cromatografía de modo mixto.

5 Es decir, el sobrenadante del cultivo se hizo pasar directamente a través del portador de modo mixto, la antitrombina se adsorbió sobre el portador, la neuraminidasa se eliminó mediante lavado, la antitrombina se eluyó, y el intervalo de eluido se determinó por HPLC, obteniendo así una composición a partir de la cual se eliminó eficazmente la neuraminidasa como factor que afecta a la calidad de la antitrombina (número de ácidos siálicos unidos).

10 **[Ejemplo 2] Ejemplo de control del número de ácidos siálicos unidos de antitrombina usando el portador de modo mixto (Ejemplo de un método para aumentar más el número de ácidos siálicos unidos usando un amortiguador de glicina) (no es un método de la invención)**

15 Se hizo pasar directamente un sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene aproximadamente 380 mg de antitrombina a través de una columna de modo mixto (fabricada por GE Healthcare, Capto adhere, volumen de columna: 38 ml) equilibrada con amortiguador AC (300 mmol/l de glicina, 100 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.0) para adsorber la antitrombina a la misma.

20 La columna se lavó con 195 ml de amortiguador AC que contiene glicina (300 mmol/l de glicina, 100 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.0), y después se aplicaron 152 ml de amortiguador AB (350 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0) para eluir la antitrombina. El número de ácidos siálicos unidos de antitrombina recuperada en el intervalo particular de fracciones después de la elución se midió de la misma manera que en el ejemplo 1.

25 Como resultado, cuando la purificación se realizó bajo las condiciones del ejemplo 2 (amortiguador AC usado para equilibrar y lavar antes de la elución), el número de ácidos siálicos unidos se incrementó a 1.3 veces, en comparación con las condiciones de purificación del ejemplo 1 (amortiguador AA usado para equilibrar y lavar antes de la elución). Se puede ver que la calidad (número de ácidos siálicos unidos) de antitrombina eluida puede mejorarse más mediante la adición de glicina al amortiguador usado para lavar antes de la elución.

30 **[Ejemplo 3] Ejemplo de control del número de ácidos siálicos unidos de antitrombina usando el portador de modo mixto (ejemplo que muestra que el amortiguador de glicina puede sustituirse por otro amortiguador de aminoácidos en el ejemplo 2) (no es un método de la invención)**

35 Se añadió hidrocloreuro de arginina o glicina de una concentración final de 0 a 500 mmol/l a la disolución acuosa que contiene antitrombina obtenida en el proceso de elución del ejemplo 1 comparativo. La actividad de neuraminidasa en cada disolución se midió de la misma manera que en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la figura 1).

40 Como se muestra en la figura 1, cuando la actividad de neuraminidasa en la cantidad de carga de aminoácido de 0 mmol/l se consideró como 1.0, la actividad relativa fue de aproximadamente 0.2 por adición de 100 mmol/l de hidrocloreuro de arginina o glicina. Además, la actividad relativa fue 0 (por debajo del límite de detección) mediante la adición de 200 mmol/l o más de arginina, o 300 mmol/l o más de glicina.

45 Estos resultados indican que la purificación como en el ejemplo 2 puede realizarse mediante la sustitución de glicina por otro aminoácido, tal como arginina o similar.

50 **[Ejemplo 4] Ejemplo de purificación total de la forma α de antitrombina mediante combinaciones del portador de modo mixto y otras cromatografías**

55 Se purificó un sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene alrededor de 1.43 g de antitrombina de la misma manera que en el ejemplo 2 (excepto que se usó amortiguador AD (450 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.0) en lugar de amortiguador AC), y su intervalo particular se recuperó, obteniendo así 236 ml del líquido recuperado. La recuperación de antitrombina en este proceso fue tan buena como 80%.

60 La disolución acuosa que contiene antitrombina recuperada en el proceso mencionado anteriormente se mezcló con Triton X-100 y fosfato de tributilo a sus concentraciones de 1% y 0.3%, respectivamente, seguido de agitación suave. Esta disolución se diluyó varias veces con agua purificada, y después se hizo pasar a través de la columna (fabricada por Merck Millipore, Eshmuno Q, volumen de columna: 19.6 ml) equilibrada con amortiguador AE (20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0) para adsorber la antitrombina a la misma.

65 La columna se lavó usando 3 volúmenes de columna de amortiguador AE (20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0), y después se aplicaron 4 volúmenes de columna de amortiguador AB (350 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0) para eluir la antitrombina.

Se añadió amortiguador de fosfato de sodio o agua purificada a la disolución acuosa que contenía antitrombina recuperada en el proceso mencionado anteriormente, y el pH y la conductividad se ajustaron a 6.0 y 25.2 mS/cm, respectivamente. Esta disolución se hizo pasar a través de la columna (fabricada por JNC, Cellufine Sulfate, volumen de columna: 23.7 ml) equilibrada con amortiguador AF (170 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.0) para recuperar y neutralizar una disolución que se hizo pasar a través de la columna.

Se llevó a cabo una dilución de varias veces de la disolución acuosa que contiene antitrombina recuperada de este modo en el proceso mencionado anteriormente, usando amortiguador AG (1.5 mol/l de citrato de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0). Esta disolución se hizo pasar a través de la columna (fabricada por GE Healthcare, Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, volumen de columna: 4.9 ml) equilibrada con amortiguador AH (1 mol/l de citrato de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 8.0) para adsorber la antitrombina a la misma.

La columna se lavó con 2 volúmenes de columna de amortiguador AH (1 mol/l de citrato de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 8.0), y después se eluyó la antitrombina con un gradiente lineal de citrato de sodio.

La disolución acuosa que contenía antitrombina recuperada de este modo en el proceso mencionado anteriormente se concentró usando una membrana de ultrafiltración (fabricada por Merck Millipore, un corte de peso molecular: 10 kilodaltons) hasta una concentración adecuada, y después se cambió el amortiguador por amortiguador AI (20 g/l de glicina, 12 g/l de amortiguador de citrato de sodio, pH 7.5). El número de ácidos siálicos unidos de esta disolución se midió de la misma manera que en el ejemplo 1.

Como resultado, el número de ácidos siálicos unidos se calculó como 6.7 mol/mol (relación de unión: 84%), lo que indica que la forma α de antitrombina que tiene el número de ácidos siálicos unidos de 6 o más (relación de unión: 75% o más) se puede purificar mediante una combinación del portador multimodal y diferentes procesos de cromatografía.

[Ejemplo 5] Comparación de portador de modo mixto y portador de intercambio aniónico en la recuperación directa de antitrombina del sobrenadante de cultivo

Cada 1 ml de Capto adhere fabricado por GE Healthcare, Q Sepharose Fast Flow fabricado por GE Healthcare, Eshmuno Q fabricado por Merck Millipore y Toyopearl Q-600C AR fabricado por TOSOH Corporation se dividieron en alícuotas en tubos, y se equilibraron con amortiguador AE (20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0), y se usaron como suspensiones al 50% (total 2 ml).

El sobrenadante de cultivo de células CHO (11 ml) que contiene antitrombina se añadió directamente a las suspensiones, y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de completar la agitación, se midió la concentración de antitrombina en el sobrenadante de la misma manera que en el ejemplo 1. La cantidad de adsorción de antitrombina (g) por unidad de volumen de portador (1 l) se calculó a partir de la cantidad reducida de antitrombina en el sobrenadante del cultivo mediante la siguiente ecuación. Los resultados se muestran en la figura 2.

$$(Cantidad\ de\ adsorción\ de\ antitrombina\ (g)\ por\ volumen\ unitario\ de\ portador\ (1\ l)) = [(cantidad\ de\ antitrombina\ en\ el\ sobrenadante\ del\ cultivo) - (cantidad\ de\ antitrombina\ en\ el\ sobrenadante\ tratado\ con\ portador)] / (volumen\ de\ portador)$$

Como se muestra en la figura 2, el portador de modo mixto, Capto adhere, mostró una cantidad de adsorción mucho mayor que otros portadores de intercambio aniónico.

Estos resultados mostraron que el portador de intercambio aniónico mostró que la cantidad de adsorción de antitrombina en el fluido de cultivo era la mitad o inferior que la del portador de modo mixto. Es decir, la cantidad de adsorción de antitrombina en el portador de intercambio aniónico es notablemente baja y, por lo tanto, el portador de intercambio aniónico no es adecuado para usarse directamente para la purificación a escala industrial del fluido de cultivo.

[Ejemplo 6] Un método para recuperar directamente la proteína S del sobrenadante de cultivo usando el portador de modo mixto y una diferencia en el rendimiento entre el portador de modo mixto y el portador de intercambio aniónico (no es un método de la invención)

El sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 20.0 mg de proteína S (el pH se ajustó a 5.0, y los precipitados se eliminaron por centrifugación) se hizo pasar directamente a través de la columna de modo mixto (fabricada por GE Healthcare, Capto MMC, volumen de columna: 3.9 ml) equilibrada con amortiguador PA (20 mmol/l de fosfato de sodio, 10 mmol/l de amortiguador de citrato de sodio, pH 5.0) para adsorber la proteína S a la misma.

La columna se lavó con 19.6 ml de amortiguador PA, y después se aplicaron 39.3 ml de amortiguador PB (20 mmol/l de fosfato de sodio, 10 mmol/l de amortiguador de citrato de sodio, pH 7.0) para eluir la proteína S.

5 Posteriormente, se aplicaron 19.6 ml de disolución PC (20 mmol/l de fosfato de sodio, 10 mmol/l de citrato de sodio, 500 mmol/l de disolución de cloruro de sodio, pH 7.0) para eluir la proteína S que queda en la columna [esto se denomina como Purificación (1)].

10 El sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 84.9 mg de proteína S se hizo pasar directamente a través de la columna de modo mixto (fabricada por GE Healthcare, Capto MMC, volumen de columna: 3.9 ml) equilibrada con amortiguador PA para adsorber la proteína S a la misma.

15 La columna se lavó con 24.9 ml de amortiguador PA, y después se aplicaron 39.3 ml de amortiguador PB para eluir la proteína S. Posteriormente, se aplicaron 20.1 ml de disolución PC (20 mmol/l de fosfato de sodio, 10 mmol/l de citrato de sodio, 500 mmol/l de disolución de cloruro de sodio, pH 7.0) para eluir la proteína S que queda en la columna [esto se denomina purificación (2)].

20 El sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 20.0 mg de proteína S se hizo pasar directamente a través de la columna de intercambio catiónico (fabricada por Merck Millipore, Fractogel SE Hicap, volumen de columna: 3.9 ml) equilibrada con amortiguador PA (20 mmol/l de fosfato de sodio, 10 mmol/l de amortiguador de citrato de sodio, pH 5.0) para adsorber la proteína S a la misma.

25 La columna se lavó con 24.1 ml de amortiguador PA, y después se aplicaron 39.3 ml de amortiguador PB (20 mmol/l de fosfato de sodio, 10 mmol/l de amortiguador de citrato de sodio, pH 7.0) para eluir la proteína S.

Posteriormente, se aplicaron 19.6 ml de disolución PC (20 mmol/l de fosfato de sodio, 10 mmol/l de citrato de sodio, 500 mmol/l de disolución de cloruro de sodio, pH 7.0) para eluir la proteína S que queda en la columna [esto se denomina como Purificación (3)].

30 El sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 8 a 10 mg de proteína S se hizo pasar directamente a través de la columna de intercambio aniónico (fabricada por GE Healthcare, Q Sepharose XL, volumen de columna: 0.98 ml) equilibrada con amortiguador PG (20 mmol/l de hidrócloruro de Tris, 150 mmol/l de disolución de cloruro de sodio, pH 7.4) para adsorber la proteína S a la misma.

35 La columna se lavó con 7.9 ml de amortiguador PG, y después se aplicaron 7.9 ml de amortiguador PH (20 mmol/l de hidrócloruro de Tris, 200 mmol/l de disolución de cloruro de sodio, pH 7.4) para eluir la proteína S. Posteriormente, se aplicaron 7.9 ml de amortiguador PI (20 mmol/l de hidrócloruro de Tris, 1 mol/l de disolución de cloruro de sodio, pH 7.4) para eluir la proteína S que queda en la columna [esto se denomina purificación (4)].

40 El sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 8 a 10 mg de proteína S se hizo pasar directamente a través de la columna de intercambio aniónico (fabricada por GE Healthcare, Capto Q, volumen de columna: 0.98 ml) equilibrada con amortiguador PG, para adsorber la proteína S a la misma.

45 La columna se lavó con 7.9 ml de amortiguador PG, y después se aplicaron 7.9 ml de amortiguador PH para eluir la proteína S. Posteriormente, se aplicaron 7.9 ml de amortiguador PI para eluir la proteína S que queda en la columna [esto se denomina Purificación (5)].

50 El sobrenadante de cultivo de la proteína S y la proteína S en las disoluciones de lavado antes de la elución y en los eluidos en la Purificación (1) a (5) se midieron mediante el método de HPLC de fase inversa [J. Chromatography B, 662, 209(1994)], y se calculó la recuperación. Los resultados se muestran en la tabla 2.

[Tabla 2]

Rendimiento de proteína S en fracción eluida de cada portador					
	Purificación (1)	Purificación (2)	Purificación (3)	Purificación (4)	Purificación (5)
Portador de cromatografía usado	Capto MMC	Capto MMC	Fractogel SE Hicap (M)	Q Sepharose XL	Capto Q
Cantidad de adsorción por 1 ml de portador (mg)	5.1	21.6	5.1	8 a 10	8 a 10
Rendimiento en la fracción eluida (%)	91.9	85.7	21.6	24.1	13.1

55 Como se muestra en la tabla 2, el rendimiento del proceso de proteína S en el portador de modo mixto fue tan bueno como 80%, independientemente de la cantidad de carga. Por el contrario, mientras que la cantidad de

adsorción por 1 ml de otro portador fue tan baja como 10 mg o menos, la recuperación fue tan notablemente baja como 25% o menos.

Estos resultados sugieren que la cantidad de adsorción de proteína S sobre el portador de intercambio iónico fue muy baja, y por lo tanto el portador de intercambio iónico no es adecuado para uso a escala industrial cuando se purifica directamente la proteína S directamente del fluido de cultivo.

[Ejemplo 7] Eliminación de agregados de proteína S en la purificación de proteína S del sobrenadante de cultivo usando el portador de modo mixto (no es un método de la invención)

El pH del sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 84.4 mg de proteína S se ajustó a 5.0, y los precipitados se eliminaron por centrifugación. Esta disolución se hizo pasar directamente a través de la columna de modo mixto (fabricada por GE Healthcare, Capto MMC, volumen de columna: 3.9 ml) equilibrada con amortiguador PJ (50 mmol/l de ácido acético, pH 5.3) para adsorber la proteína S a la misma.

La columna se lavó con 19.6 ml de amortiguador PJ, y después se aplicaron 36.9 ml de amortiguador PK (200 mmol/l de fosfato de sodio, pH 7.0) para eluir la proteína S. Posteriormente, se aplicaron 19.6 ml de disolución PL (1 mol/l de disolución de cloruro de sodio) para eluir la proteína S que queda en la columna. Los resultados se muestran en la figura 3).

La presencia o ausencia del agregado de proteína S en la fracción eluida se analizó mediante transferencia Western con electroforesis nativa. Cada fracción se cargó sobre un gel de Tris-Glicina al 4-12% (fabricado por Invitrogen) de modo que la cantidad de proteína de la proteína S es 1 µg, seguido de electroforesis. Posteriormente, la proteína se transfirió sobre una membrana de PVDF, y la proteína S se marcó con anticuerpos primarios y secundarios. Las imágenes de la banda de la proteína S se obtuvieron por desarrollo de color HRP. Los resultados se muestran en la figura 4).

Como resultado, como se muestra en las figuras 3 y 4, las fracciones que contienen la proteína S con la calidad deseada se determinaron como B a E. La recuperación de la proteína S incluida en este intervalo de eluido fue 84%, y el contenido del agregado asimismo fue bajo.

Como se describió anteriormente, el sobrenadante de cultivo se aplicó directamente al portador de modo mixto, la proteína S se adsorbió sobre el portador, se llevó a cabo el proceso de lavado, se seleccionaron las condiciones adecuadas de pH y concentración de sal, se eluyó la proteína S, y se seleccionó el intervalo de elución, obteniendo así una fracción de la cual se eliminaron con éxito los agregados de proteína S.

[Ejemplo 8] Diferencias en la pureza y la capacidad de fraccionamiento del agregado entre el portador de modo mixto y el portador de cromatografía hidrófoba en la purificación de la proteína S del sobrenadante de cultivo (no es un método de la invención)

El pH del sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 9.9 mg de proteína S se ajustó a 5.0 usando fosfato, y los precipitados se eliminaron por centrifugación. Esta disolución se hizo pasar directamente a través de la columna de modo mixto (fabricada por GE Healthcare, Capto MMC, volumen de columna: 0.98 ml) equilibrada con amortiguador PM (20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 5.0) para adsorber la proteína S a la misma.

La columna se lavó con 9.8 ml de amortiguador PM, y después se aplicó amortiguador PN (20 mmol/l de hidrocloreuro de Tris, pH 7.0) para eluir la proteína S [esto se denomina Purificación (6)]. Los patrones de fracción del pico de elución de la Purificación (6) se muestran en la figura 5).

Se añadió una disolución PO (cloruro de sodio en disolución saturada de citrato de sodio) al sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 10.7 mg de proteína S para representar el 30% del volumen total (pretratamiento), y los precipitados se eliminaron por centrifugación.

Esta disolución se hizo pasar directamente a través de la columna de cromatografía hidrófoba (fabricada por GE Healthcare, Phenyl Sepharose 6 FF, 0.98 ml) equilibrada con la disolución PP (dilución 3 veces de la disolución PO con agua ultrapura) para adsorber la proteína S a la misma. La columna se lavó con 15.5 ml de disolución PP, y después se aplicó agua purificada para eluir la proteína S [esto se denomina purificación (7)]. Los patrones de fracción del pico de elución de la purificación (7) se muestran en la figura 6. Por el contrario, cuando el sobrenadante de cultivo de la proteína S se aplicó directamente a un portador de modo hidrófobo, la proteína S no se adsorbió al mismo.

El análisis de SDS-PAGE se realizó usando fracciones de las principales regiones de pico de purificaciones (6) y (7). Cada fracción se aplicó a un gel de Tris-Glicina al 4-20% (fabricado por Invitrogen) para que la cantidad de proteína de proteína S sea 2.5 µg, seguido de electroforesis y tinción con CBB. Los resultados se muestran en la figura 7.

Como se muestra en la figura 7, se encontró que el eluido obtenido por la purificación (6) tenía una pureza de proteína S mayor que el eluido obtenido por la purificación (7). Además, en la purificación (6), no se detectaron bandas en la región de mayor peso molecular que las bandas de proteína S, lo que indica que la purificación por el portador de modo mixto es más excelente en términos de eliminación de agregados que la purificación por cromatografía hidrófoba.

[Ejemplo 9] Ejemplo de control del número de ácidos siálicos unidos de antitrombina usando el portador de modo mixto (Ejemplo de un método para aumentar más el número de ácidos siálicos unidos usando un amortiguador de glicina)

Se hizo pasar directamente un sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 428 mg de antitrombina a través de la columna de modo mixto (fabricada por GE Healthcare, Capto adhere, volumen de columna: 28.5 ml) equilibrada con amortiguador AC (300 mmol/l de glicina, 100 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.0) para adsorber la antitrombina a la misma.

La columna se lavó con 228 ml de amortiguador AC que contiene glicina (300 mmol/l de glicina, 100 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.0), y después se aplicaron 143 ml de amortiguador AB (350 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0) para eluir la antitrombina. El número de ácidos siálicos unidos de antitrombina recuperados en el intervalo particular de fracciones después de la elución se midió de la misma manera que en el ejemplo 1.

Como resultado, cuando la purificación se realizó bajo las condiciones del ejemplo 9 (amortiguador AC usado para equilibrar y lavar antes de la elución), el número de ácidos siálicos unidos (calidad de antitrombina) se incrementó a 1.3 veces, en comparación con las condiciones de purificación del ejemplo 1 (amortiguador AA usado para equilibrar y lavar antes de la elución). Se puede ver que la calidad (número de ácidos siálicos unidos) de antitrombina eluida puede mejorarse más mediante la adición de glicina al amortiguador usado para lavar antes de la elución.

[Ejemplo 10] Un método para recuperar directamente la proteína S del sobrenadante de cultivo usando el portador de modo mixto y una diferencia en el rendimiento entre el portador de modo mixto y el portador de intercambio aniónico (no es un método de la invención)

El sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 19.9 mg de proteína S (el pH se ajustó a 5.0, y los precipitados se eliminaron por centrifugación) se hizo pasar directamente a través de la columna de modo mixto (fabricada por GE Healthcare, Capto MMC, volumen de columna: 3.9 ml) equilibrada con amortiguador PA (20 mmol/l de fosfato de sodio, 10 mmol/l de amortiguador de citrato de sodio, pH 5.0) para adsorber la proteína S a la misma.

La columna se lavó con 19.6 ml de amortiguador PA, y después se aplicaron 41.9 ml de amortiguador PB (20 mmol/l de fosfato de sodio, 10 mmol/l de amortiguador de citrato de sodio, pH 7.0) para eluir la proteína S. Posteriormente, se aplicaron 19.6 ml de amortiguador PC (20 mmol/l de fosfato de sodio, 10 mmol/l de citrato de sodio, 500 mmol/l de disolución de cloruro de sodio, pH 7.0) para eluir la proteína S que queda en la columna [esto se denomina purificación (1)].

El sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 87.7 mg de proteína S se hizo pasar directamente a través de la columna de modo mixto (fabricada por GE Healthcare, Capto MMC, volumen de columna: 3.9 ml) equilibrada con amortiguador PA para adsorber la proteína S a la misma. La columna se lavó con 24.9 ml de amortiguador PD (50 mmol/l de fosfato de sodio, 25 mmol/l de amortiguador de citrato de sodio, pH 5.0), y después se aplicaron 39.3 ml de amortiguador PE (50 mmol/l de fosfato de sodio, 25 mmol/l de amortiguador de citrato de sodio, pH 7.0) para eluir la proteína S.

Posteriormente, se aplicaron 20.1 ml de amortiguador PF (50 mmol/l de fosfato de sodio, 25 mmol/l de citrato de sodio, 500 mmol/l de disolución de cloruro de sodio, pH 7.0) para eluir la proteína S que queda en la columna [esto se denomina purificación (2)].

El sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 21.8 mg de proteína S se hizo pasar directamente a través de la columna de intercambio catiónico (fabricada por Merck Millipore, Fractogel SE Hicap, volumen de columna: 3.9 ml) equilibrada con amortiguador PA (20 mmol/l de fosfato de sodio, 10 mmol/l de amortiguador de citrato de sodio, pH 5.0) para adsorber la proteína S a la misma.

La columna se lavó con 18.3 ml de amortiguador PA, y después se aplicaron 39.3 ml de amortiguador PB (20 mmol/l de fosfato de sodio, 10 mmol/l de amortiguador de citrato de sodio, pH 7.0) para eluir la proteína S. Posteriormente, se aplicaron 19.6 ml de amortiguador PC (20 mmol/l de fosfato de sodio, 10 mmol/l de citrato de sodio, 500 mmol/l de disolución de cloruro de sodio, pH 7.0) para eluir la proteína S que queda en la columna [esto se denomina purificación (3)].

5 El sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 8 a 10 mg de proteína S se hizo pasar directamente a través de la columna de intercambio aniónico (fabricada por GE Healthcare, Q Sepharose XL, volumen de columna: 0.98 ml) equilibrada con amortiguador PG (20 mmol/l de hidrocloreuro de Tris, 150 mmol/l de disolución de cloruro de sodio, pH 7.4) para adsorber la proteína S a la misma.

10 La columna se lavó con 7.9 ml de amortiguador PG, y después se aplicaron 7.9 ml de amortiguador PH (20 mmol/l de hidrocloreuro de Tris, 200 mmol/l de disolución de cloruro de sodio, pH 7.4) para eluir la proteína S. Posteriormente, se aplicaron 7.9 ml de amortiguador PI (20 mmol/l de hidrocloreuro de Tris, 1 mol/l de disolución de cloruro de sodio, pH 7.4) para eluir la proteína S que queda en la columna [esto se denomina purificación (4)].

15 El sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 8 a 10 mg de proteína S se hizo pasar directamente a través de la columna de intercambio aniónico (fabricada por GE Healthcare, Capto Q, volumen de columna: 0.98 ml) equilibrada con amortiguador PG para adsorber la proteína S a la misma. La columna se lavó con 7.9 ml de amortiguador PG, y después se aplicaron 7.9 ml de amortiguador PH para eluir la proteína S. Posteriormente, se aplicaron 7.9 ml de amortiguador PI para eluir la proteína S que queda en la columna [esto se denomina purificación (5)].

20 El sobrenadante de cultivo de la proteína S y la proteína S en las disoluciones de lavado antes de la elución y en los eluidos en la purificación (1) a (5) se midieron mediante el método de HPLC de fase inversa [J. Chromatography B, 662, 209 (1994)], y se calculó la recuperación. Los resultados se muestran en la tabla 3.

[Tabla 3]

Rendimiento de proteína S en fracción eluida de cada portador					
	Purificación (1)	Purificación (2)	Purificación (3)	Purificación (4)	Purificación (5)
Portador de cromatografía usado	Capto MMC	Capto MMC	Fractogel SE Hicap (M)	Q Sepharose XL	Capto Q
Cantidad de adsorción por 1 ml de portador (mg)	5.1	22.3	5.6	8 a 10	8 a 10
Rendimiento en la fracción eluida (%)	91.9	85.8	21.7	24.1	13.1

25 Como se muestra en la tabla 3, el rendimiento del proceso de proteína S en el portador de modo mixto fue tan bueno como 80% o más, independientemente de la cantidad de carga. Por el contrario, mientras que la cantidad de adsorción por 1 ml de otro portador fue tan baja como 10 mg o menos, la recuperación fue notablemente tan baja como 25% o menos.

30 Estos resultados sugieren que la cantidad de adsorción de proteína S sobre el portador de intercambio iónico fue muy baja y, por lo tanto, el portador de intercambio iónico no es adecuado para uso a escala industrial cuando se purifica la proteína S directamente del fluido de cultivo.

35 **[Ejemplo 11] Un método para recuperar directamente la eritropoyetina del sobrenadante de cultivo usando el portador de modo mixto (no es un método de la invención)**

40 El sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 118 mg de eritropoyetina se hizo pasar directamente a través de la columna de modo mixto (fabricada por GE Healthcare, Capto adhere, volumen de columna: 5.9 ml) equilibrada con amortiguador EA (10 mmol/l de amortiguador de Tris, pH 6.4) para adsorber eritropoyetina a la misma.

45 La columna se lavó con 29.5 ml de amortiguador EA (10 mmol/l de amortiguador de Tris, pH 6.4), y después se eluyó la eritropoyetina con un gradiente lineal de cloruro de sodio usando 29.5 ml de amortiguador EA (10 mmol/l de amortiguador de Tris, pH 6.4) y amortiguador EB (500 mmol/l de cloruro de sodio, 10 mmol/l de amortiguador de Tris, pH 6.4).

50 Las concentraciones de eritropoyetina en la fracción de lavado antes de la elución y en un intervalo particular de eluido se midieron por resonancia de plasmones superficiales (Biacore3000, fabricado por GE Healthcare) usando un chip sensor inmovilizado con anticuerpo anti-eritropoyetina.

55 Como resultado, la cantidad de adsorción de eritropoyetina por volumen unitario de portador (1 l) fue 3 g. Por lo tanto, se puede ver que la eritropoyetina se puede recuperar directamente del sobrenadante de cultivo usando el portador de modo mixto.

[Ejemplo 12] Inhibición de las actividades de neuraminidasa y proteasa mediante la adición de aminoácidos (disolución acuosa que contiene proteína S) (no es un método de la invención)

5 El sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 299 mg de proteína S (el pH se ajustó a 5.0, y los precipitados se eliminaron por centrifugación) se hizo pasar directamente a través de la columna de modo mixto (fabricada por GE Healthcare, Capto MMC, volumen de columna: 32.8 ml) equilibrada con amortiguador PQ (50 mmol/l de disolución de ácido acético, pH 5.0) para adsorber la proteína S a la misma.

10 La columna se lavó con 164 ml de amortiguador PQ (50 mmol/l de disolución de ácido acético, pH 5.0), y después se aplicaron 262.4 ml de amortiguador PR (100 mmol/l de disolución de fosfato de sodio, pH 7.0) para eluir la proteína S.

15 Se añadió neuraminidasa (fabricada por Nacalai Tesque) a la disolución acuosa que contiene proteína S a una concentración final de 0.0005 U/ml. Como grupo de control, se añadió agua purificada en la misma cantidad que la neuraminidasa. Se añadió glicina a una concentración final de 1.0 mol/l, o agua purificada como control, y se mantuvo a 37°C durante 3 horas.

20 El disolvente del producto se sustituyó por agua purificada, y después se realizó una electroforesis de enfoque isoelectrico (pH3-7 IEF Gel, fabricado por Invitrogen, cantidad de carga de proteína de proteína S: 10 µg) para el análisis. Los resultados se muestran en la figura 8.

25 Como se muestra en la figura 8, el perfil electroforético de la disolución acuosa que contiene proteína S en la que se añadió agua purificada mostró un cambio básico. Por el contrario, el perfil electroforético de la disolución acuosa que contiene la proteína S en la que se añadió glicina mostró un cambio básico en comparación con el perfil electroforético antes del inicio, pero se encontraron bandas principales en una región más ácida que la banda de aquella a la que se añadió agua purificada.

30 Estos resultados sugieren que la actividad de la neuraminidasa se inhibe mediante la adición de aminoácidos para mantener la calidad (número de ácidos siálicos unidos) de la proteína S.

35 De manera similar, se añadió glicina (concentración final de 0.5 mol/l), arginina (concentración final de 0.4 mol/l) o agua purificada a la disolución acuosa que contiene proteína S que se obtuvo en el proceso cromatográfico usando el portador de modo mixto descrito en 6 anterior, respectivamente, y se mantiene a 25°C o 4°C durante 6 días. Se realizó para el análisis el método de SDS-PAGE (gel de Tris-Glicina al 4-20%, fabricado por Invitrogen, cantidad de carga de proteína de proteína S: 2.4 µg). Los resultados se muestran en la figura 9.

40 Como se muestra en la figura 9, se encontró que la proteína S se convirtió completamente en la forma escindida en la muestra añadida con agua purificada, mientras que la conversión de la proteína S en la forma escindida se inhibió en las muestras a las que se añadieron glicina y arginina. Estos resultados sugieren que la actividad de la proteasa se inhibe mediante la adición de aminoácidos, lo que inhibe la formación de la forma escindida de la proteína S.

[Ejemplo 13] Inhibición de la actividad de la neuraminidasa mediante la adición de aminoácidos (disolución acuosa que contiene eritropoyetina) (no es un método de la invención)

45 Agua purificada, 1 mol/l de disolución de alanina, 1 mol/l de disolución de arginina, o 1 mol/l de disolución de glicina se mezcló con el fluido de cultivo que contiene eritropoyetina en una cantidad equivalente, respectivamente, y después se mantuvo a 25°C durante 7 días. Posteriormente, la eritropoyetina se purificó usando una columna de cromatografía de afinidad inmovilizada con anticuerpo anti-eritropoyetina, y el número de ácidos siálicos que se unen a la eritropoyetina se midió por electroforesis capilar [Biol. Pharm. Bull. 33(9) 1596-1599 (2010)]. Los resultados se muestran en la figura 10.

50 Como se muestra en la figura 10, el componente que muestra el número relativamente alto de ácidos siálicos unidos desapareció en la disolución a la que se añadió agua purificada, mientras que el número de ácidos siálicos unidos se mantuvo en la disolución a la que se añadieron aminoácidos, en comparación con la disolución a la que se añadió agua purificada. El efecto fue fuerte en este orden: arginina, glicina, y alanina. En las condiciones de arginina añadida, en particular, el número de ácidos siálicos unidos fue equivalente, en comparación con aquel al inicio de la incubación. Estos resultados sugieren que la actividad de neuraminidasa en la disolución acuosa de eritropoyetina se inhibe mediante la adición de aminoácidos.

[Ejemplo 14] Ejemplo de purificación de la forma α de antitrombina por combinación de adición de aminoácidos y otra cromatografía

65 Se realizó una dilución de varias veces del sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 5.79 g de antitrombina usando agua purificada, y después se hizo pasar a través de la columna (fabricada por Merck, Eshmuno Q, volumen de columna: 456 ml) equilibrada con amortiguador AR (300 mmol/l de glicina, 20 mmol/l de

amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0) para adsorber la antitrombina a la misma.

5 La columna se lavó con 6 volúmenes de columna de amortiguador AR (300 mmol/l de glicina, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0), y después se aplicaron 4 volúmenes de columna de amortiguador AS (350 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.0) para eluir la antitrombina. Se obtuvieron 954 ml del líquido recuperado. El pH de este líquido recuperado se ajustó a 7.0 usando amortiguador AT (250 mmol/l de amortiguador de glicina, pH 10.0). La recuperación de antitrombina en este proceso fue tan buena como 95%.

10 La disolución acuosa que contiene antitrombina recuperada de este modo en el proceso mencionado anteriormente se mezcló con Triton X-100 y fosfato de tributilo a sus concentraciones de 1% y 0.3%, respectivamente, seguido de agitación suave. La dilución de varias veces de esta disolución se llevó a cabo usando agua purificada, y la disolución se hizo pasar a través de la columna (fabricada por Merck, Eshmun Q, volumen de columna: 209 ml) equilibrada con amortiguador AE (20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0) para adsorber la antitrombina a la misma.

15 La columna se lavó con 3 volúmenes de columna de amortiguador AE (20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0) y después se aplicaron 4 volúmenes de columna de amortiguador AS (350 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.0) para eluir la antitrombina. El pH de este líquido recuperado se ajustó a 7.0 con amortiguador AT (250 mmol/l de amortiguador de glicina, pH 10.0). La recuperación de antitrombina en este proceso fue tan buena como 100%.

20 Se añadió amortiguador de fosfato de sodio o agua purificada a la disolución acuosa que contiene antitrombina recuperada de este modo en el proceso mencionado anteriormente, y el pH y la conductividad se ajustaron a 6.0 y 24.1 mS/cm, respectivamente. Esta disolución se hizo pasar a través de la columna (fabricada por JNC, Cellufine Sulfate, volumen de columna: 530 ml) equilibrada con amortiguador AU (160 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.0) para recuperar y neutralizar una disolución que se hizo pasar a través de la columna.

25 La dilución de varias veces de la disolución acuosa que contiene antitrombina recuperada en el proceso mencionado anteriormente se llevó a cabo con amortiguador AG (1.5 mol/l de citrato de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0). Esta disolución se hizo pasar a través de la columna (fabricada por GE Healthcare, Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, volumen de columna: 177 ml) equilibrada con amortiguador AH (1 mol/l de citrato de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 8.0) para adsorber la antitrombina a la misma.

30 La columna se lavó con 2 volúmenes de columna de amortiguador AH (1 mol/l de citrato de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 8.0), y después se eluyó la antitrombina con un gradiente lineal de citrato de sodio.

35 La disolución acuosa que contiene antitrombina recuperada de este modo en el proceso mencionado anteriormente se concentró mediante la membrana de ultrafiltración (fabricada por Merck, un corte de peso molecular: 10 kilodaltons) hasta una concentración adecuada, seguido del intercambio con amortiguador AI (20 g/l de glicina, 12 g/l de amortiguador de citrato de sodio, pH 7.5), obteniendo así una disolución acuosa que contiene la forma α de antitrombina purificada.

El número de ácidos siálicos unidos de esta disolución se midió de la misma manera que en el ejemplo 1. Como resultado, el número de ácidos siálicos unidos fue 6.6 mol/mol, y la relación de unión del ácido siálico fue 83%.

50 **[Ejemplo 15] Ejemplo de purificación de la forma α de antitrombina por combinación de portador de modo mixto y otra cromatografía**

Se purificó un sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 3.14 g de antitrombina de la misma manera que en el ejemplo 2 (excepto que se usó amortiguador AD (450 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.0) en lugar de amortiguador AC, y el volumen de la columna fue 114 ml), y se recuperó el intervalo particular de fracciones, obteniendo de este modo 706 ml del líquido recuperado. La recuperación de antitrombina en este proceso fue tan buena como 89%.

60 La disolución acuosa que contiene antitrombina recuperada de este modo en el proceso mencionado anteriormente se mezcló con TritonX-100 y fosfato de tributilo a sus concentraciones de 1% y 0.3%, respectivamente, seguido de agitación suave. Esta disolución se diluyó varias veces con agua purificada, y después se hizo pasar a través de la columna (fabricada por Merck, Eshmun Q, volumen de columna 28.5 ml) equilibrada con amortiguador AE (20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0) para adsorber la antitrombina a la misma.

65 La columna se lavó con 3 volúmenes de columna de amortiguador AE (20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0), y después se aplicaron 4 volúmenes de columna de amortiguador AB (350 mmol/l de cloruro de

sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0) para eluir la antitrombina.

Se añadió amortiguador de fosfato de sodio o agua purificada a la disolución acuosa que contiene antitrombina recuperada en el proceso mencionado anteriormente, y el pH y la conductividad se ajustaron a 6.0 y 34.8 mS/cm, respectivamente. Esta disolución se hizo pasar a través de la columna (fabricada por GE Healthcare, Capto DeVirS, volumen de columna: 23.7 ml) equilibrada con amortiguador AF (170 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.0) para recuperar y neutralizar una disolución que se hizo pasar a través de la columna.

La dilución de varias veces de la disolución acuosa que contiene antitrombina recuperada de este modo en el proceso mencionado anteriormente se llevó a cabo con amortiguador AG (1.5 mol/l de citrato de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0). Esta disolución se hizo pasar a través de la columna (fabricada por GE Healthcare, Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, volumen de columna: 23.7 ml) equilibrada con amortiguador AH (1 mol/l de citrato de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 8.0) para adsorber la antitrombina a la misma.

La columna se lavó con 2 volúmenes de columna de amortiguador AH (1 mol/l de citrato de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 8.0), y después se eluyó la antitrombina con un gradiente lineal de citrato de sodio.

La disolución acuosa que contiene antitrombina recuperada en el proceso mencionado anteriormente se concentró mediante la membrana de ultrafiltración (fabricada por Merck, un corte de peso molecular: 10 kilodaltons) hasta una concentración adecuada, seguido del intercambio con amortiguador AI (20 g/l de glicina, 12 g/l de amortiguador de citrato de sodio, pH 7.5), obteniendo así una disolución acuosa que contiene la forma α de antitrombina purificada. El número de ácidos siálicos unidos de esta disolución se midió de la misma manera que en el ejemplo 1. Como resultado, el número de ácidos siálicos unidos fue 6.9 mol/mol, y la relación de unión del ácido siálico fue 86%.

[Ejemplo 16] Ejemplo de purificación de proteína S por combinación de portador de modo mixto y otra cromatografía (no es un método de la invención)

El sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 102.1 mg de proteína S (el pH se ajustó a 5.0, y los precipitados se eliminaron por centrifugación) se hizo pasar directamente a través de la columna de modo mixto (fabricada por GE Healthcare, Capto MMC, volumen de columna: 15.7 ml) equilibrada con amortiguador PQ (50 mmol/l de disolución de ácido acético, pH 5.0) para adsorber la proteína S a la misma.

La columna se lavó con 78.5 ml de amortiguador PQ (50 mmol/l de disolución de ácido acético, pH 5.0), y se aplicaron 157 ml de amortiguador PR (100 mmol/l de disolución de fosfato de sodio, pH 7.0) para eluir la proteína S, y se recuperaron 242.2 ml de disolución acuosa que contiene proteína S. La recuperación de la proteína S en este proceso fue tan buena como 89.5%.

Se añadió una disolución de glicina a la disolución acuosa que contiene proteína S recuperada en el proceso mencionado anteriormente a una concentración final de 1.0 mol/l, seguido de agitación suave. Esta disolución se hizo pasar a través de la columna (fabricada por GE Healthcare, Q Sepharose High Performance, volumen de columna: 17.7 ml) equilibrada con amortiguador PS (10 mmol/l de amortiguador de Tris, pH 7.0) para adsorber la proteína S a la misma.

La columna se lavó con 88.5 ml de amortiguador PS (10 mmol/l de amortiguador de Tris, pH 7.0), y después se aplicaron 354 ml de amortiguador PT (10 mmol/l de amortiguador de Tris, 0.5 mol/l de disolución de NaCl, pH 7.0) para eluir la proteína S. Se recuperaron 26.17 ml de disolución acuosa que contiene proteína S.

Se añadió una disolución de glicina a la disolución acuosa que contiene proteína S recuperada en el proceso mencionado anteriormente a una concentración final de 1.0 mol/l, seguido de agitación suave. Esta disolución se hizo pasar a través de la columna (fabricada por Bio-Rad, CHT ceramic hydroxyapatite Type I, volumen de columna: 17.7 ml) equilibrada con amortiguador PU (10 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.8) para adsorber la proteína S a la misma.

La columna se lavó con 88.5 ml de amortiguador PU (10 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.8), y después se aplicaron 354 ml de amortiguador PV (400 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.8) para eluir la proteína S. Se recuperaron 44.29 ml de disolución acuosa que contiene proteína S.

La disolución acuosa que contiene proteína S recuperada en el proceso mencionado anteriormente se concentró mediante la membrana de ultrafiltración (fabricada por Merck, un corte de peso molecular: 30 kilodaltons) hasta una concentración adecuada, seguido del intercambio con amortiguador PW (20 mmol/l de amortiguador de Tris, 100 mmol/l de cloruro de sodio, 1 mmol/l de disolución de cloruro de calcio, pH 7.4). El rendimiento de purificación en este proceso de purificación fue 30.8%.

La proteína S obtenida por el método descrito en el ejemplo 16 (en adelante, denominada como proteína S-ejemplo 16) y la proteína S obtenida por el método descrito en el ejemplo 3 comparativo (en adelante, denominada como proteína S-ejemplo 3 comparativo) se analizaron por el método de SDS-PAGE (gel de Tris-Glicina al 4-20%, fabricado por Invitrogen, cantidad de carga de proteína de la proteína S: 2.4 µg), y los resultados se muestran en la figura 11.

Como se muestra en la figura 11, el contenido de impurezas fue bajo en proteína S-ejemplo 16.

La proteína S-ejemplo 16 y la proteína S-ejemplo 3 comparativo se mantuvieron a 37°C durante 3 días, o asimismo se congelaron a -20°C, respectivamente. Cada muestra se analizó mediante el método de SDS-PAGE (gel de Tris-Glicina al 4-20%, fabricado por Invitrogen, cantidad de carga de proteína de la proteína S: 2.4 µg), y los resultados se muestran en la figura 12.

Como se muestra en la figura 12, no hubo cambio en la proteína S-ejemplo 16, mientras que la forma escindida se incrementó en la proteína S-ejemplo 3 comparativo. Por lo tanto, se puede ver que se usa un sistema de purificación por el portador de modo mixto y los aminoácidos para mejorar la pureza de la proteína S y eliminar eficazmente la proteasa que causa el aumento de la forma escindida.

[Ejemplo 1 comparativo] Ejemplo que muestra que la neuraminidasa no puede separarse en la purificación del sobrenadante de cultivo de antitrombina por el método típico mediante el portador de modo mixto

Se hizo pasar un sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene aproximadamente 380 mg de antitrombina a través de la columna de modo mixto (fabricada por GE Healthcare, Capto adhere, volumen de columna: 38 ml) equilibrada con amortiguador AJ (100 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0) para adsorber la antitrombina.

La columna se lavó con 195 ml de amortiguador AJ (100 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0), y después se aplicaron 152 ml de amortiguador AB (350 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.0) para eluir la antitrombina.

La concentración de antitrombina y la actividad de neuraminidasa en la fracción de lavado antes de la elución y en el eluido se midieron de la misma manera que en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 4.

[Tabla 4]

Separación de antitrombina y neuraminidasa mediante cromatografía de modo mixto en el ejemplo 1 comparativo		
	Concentración de antitrombina (g/l)	Actividad de neuraminidasa (U/l)
Fracción de lavado antes de la elución	No detectada	No detectada
Eluido	2.56	20.3

Como se muestra en la tabla 4, se detectaron tanto antitrombina como neuraminidasa en el eluido. Incluso aunque el lavado se realizó antes de la elución, la antitrombina y la neuraminidasa no pudieron separarse mediante este método de purificación.

[Ejemplo 2 comparativo] Ejemplo que muestra que la calidad de la forma α de antitrombina se ve afectada por la cromatografía sin aminoácidos añadidos del fluido de cultivo diluido concentrado

El sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene alrededor de 35.3 g de antitrombina se concentró alrededor de 10 veces mediante una membrana de ultrafiltración (fabricada por Merck Millipore, un corte de peso molecular: 30 kilodaltons). El concentrado del proceso mencionado anteriormente se mezcló con TritonX-100 y fosfato de tributilo a sus concentraciones de 1% y 0.3%, respectivamente, seguido de agitación suave.

Esta disolución acuosa que contiene antitrombina recuperada del proceso mencionado anteriormente se diluyó varias veces con agua purificada, y se hizo pasar a través de la columna (fabricada por GE Healthcare, Q Sepharose Fast Flow, volumen de columna: 404 ml) equilibrada con amortiguador AK (20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.4) para adsorber la antitrombina.

La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de amortiguador AK (20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.4), y después se aplicaron 6 volúmenes de columna de amortiguador AL (160 mmol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.4) para eluir la antitrombina.

Se añadió amortiguador de fosfato de sodio a la disolución acuosa que contiene antitrombina recuperada del proceso mencionado anteriormente, y por lo tanto el pH y la conductividad se ajustaron a 6.0 y 7 mS/cm,

respectivamente. Esta disolución se hizo pasar a través de la columna (fabricada por JNC, Cellufine Sulfate, volumen de columna: 608 ml) equilibrada con amortiguador AM (20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.0) para adsorber la antitrombina.

5 La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de amortiguador AM (20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.0), y después se eluyó la antitrombina con un gradiente lineal de cloruro de sodio mediante el amortiguador AM (20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.0) y amortiguador AN (1 mol/l de cloruro de sodio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.0), y el líquido recuperado se neutralizó.

10 La disolución acuosa que contiene antitrombina recuperada de este modo del proceso mencionado anteriormente se concentró alrededor de más de 10 veces mediante una membrana de ultrafiltración (fabricada por Merck Millipore, un corte de peso molecular: 30 kilodaltons), y se filtraron los precipitados.

15 Se añadió amortiguador AO (3 mol/l de sulfato de amonio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.8) a la disolución acuosa que contiene antitrombina recuperada del proceso mencionado anteriormente para una dilución de varias veces. Esta disolución se hizo pasar a través de la columna (fabricada por GE Healthcare, Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, volumen de columna: 304 ml) equilibrada con amortiguador AP (2 mol/l de sulfato de amonio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.8) para adsorber la antitrombina

20 La columna se lavó con 3 volúmenes de columna de amortiguador AP (2 mol/l de sulfato de amonio, 20 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.8), y después se eluyó la antitrombina con un gradiente lineal de sulfato de sodio.

25 La disolución acuosa que contiene la forma α de antitrombina recuperada del proceso mencionado anteriormente se concentró mediante la membrana de ultrafiltración (un corte de peso molecular: 10 kilodaltons) hasta una concentración adecuada, y después se intercambió con amortiguador AQ (20 mmol/l de amortiguador de citrato de sodio, pH 7.0). Esta disolución se usó como producto de purificación final.

30 El número de ácidos siálicos unidos de la forma α de antitrombina contenidos en el producto de purificación final se midió de la misma manera que en el ejemplo 1. El número de ácidos siálicos unidos fue bajo en comparación con el del ejemplo 4, y se redujo a 4.5 mol/mol (relación de unión: 56%).

35 Como se describió anteriormente, cuando el portador de intercambio aniónico se usa en la primera etapa de purificación, se requiere concentrar y diluir el sobrenadante de cultivo. Cuando se concentró el sobrenadante de cultivo, la neuraminidasa contenida en el sobrenadante de cultivo asimismo se concentró y causó la escisión del ácido siálico de antitrombina por su actividad, después se redujo el número de ácidos siálicos unidos de la muestra de purificación.

40 Por lo tanto, a pesar de que la composición de proteína se purifica directamente por el portador de intercambio aniónico en la primera etapa de purificación, es difícil purificar la antitrombina mientras se mantiene su calidad.

[Ejemplo 3 comparativo] Ejemplo que muestra que el rendimiento es bajo y que la proteasa que causa el aumento de la forma escindida no se puede eliminar cuando no se usa un portador de modo mixto en la purificación del sobrenadante de cultivo que contiene la proteína S

45 El sobrenadante de cultivo de células CHO que contiene 16.1 g de proteína S se concentró usando la membrana de ultrafiltración (fabricada por Merck, un corte de peso molecular: 10 kilodaltons). El amortiguador se intercambió con amortiguador PX (20 mmol/l de amortiguador de Tris, 120 mmol/l de NaCl, pH 7.4), y el concentrado se diluyó 2 veces al mismo tiempo. La disolución así preparada se hizo pasar directamente a través de la columna de intercambio aniónico (fabricada por GE Healthcare, Q Sepharose Fast Flow, volumen de columna: 589 ml) equilibrada con amortiguador PY (20 mmol/l de amortiguador de Tris, 150 mmol/l de NaCl, pH 7.4) para adsorber la proteína S a la misma.

50 La columna se lavó con 5.9 l de amortiguador PY (20 mmol/l de amortiguador de Tris, 150 mmol/l de NaCl, pH 7.4), y después se aplicaron 1.8 l de amortiguador PZ (20 mmol/l de amortiguador de Tris, pH 7.4) para lavar adicionalmente la columna.

55 Posteriormente, la proteína S se eluyó con 5.9 l de amortiguador Pa (20 mmol/l de amortiguador de Tris, 150 mmol/l de NaCl, 25 mmol/l de CaCl_2 , pH 7.4) para recuperar una disolución acuosa que contiene proteína S.

60 Se llevó a cabo una concentración de alrededor de 6 veces de la disolución acuosa que contiene la proteína S recuperada de este modo en el proceso mencionado anteriormente mediante una membrana de ultrafiltración (fabricada por Merck, un corte de peso molecular: 10 kilodaltons), y después se cambió el amortiguador por el amortiguador PY. La disolución así preparada se hizo pasar directamente a través de la columna de intercambio aniónico (fabricada por GE Healthcare, Q Sepharose Fast Flow, volumen de columna: 393 ml) equilibrada con amortiguador PY. La columna se lavó con 2.0 l de amortiguador Pb (20 mmol/l de amortiguador de Tris, 200 mmol/l

de NaCl, pH 7.4), y después se usaron 3.9 l de amortiguador Pc (20 mmol/l de amortiguador de Tris, 500 mmol/l de NaCl, pH 7.4) para la elución, para recuperar una disolución acuosa que contiene proteína S.

5 La disolución acuosa que contiene la proteína S recuperada de este modo en el proceso mencionado anteriormente se hizo pasar directamente a través de la columna (fabricada por Bio-Rad, Macro Prep Ceramic hydroxyapatite, volumen de columna: 589 ml) equilibrada con amortiguador PU (10 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.8) para adsorber la proteína S a la misma. La columna se lavó con 2.9 l de amortiguador PU (10 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.8), y después la proteína S se eluyó con amortiguador Pd (500 mmol/l de amortiguador de fosfato de sodio, pH 6.8) para recuperar una disolución acuosa que contiene proteína S.

10 La disolución acuosa que contiene la proteína S recuperada de este modo en el proceso mencionado anteriormente se purificó adicionalmente mediante una columna (fabricada por Bio-Rad, Macro Prep Ceramic hydroxyapatite) con un volumen de columna de 196 ml de la misma manera que en el proceso mencionado anteriormente.

15 La disolución que contiene la proteína S así obtenida en el proceso mencionado anteriormente se filtró mediante Planova 20N (fabricada por Asahi Kasei Medical), y después se concentró mediante la membrana de ultrafiltración (fabricada por Merck, un corte de peso molecular: 10 kilodaltons). El amortiguador se intercambió por amortiguador PW (20 mmol/l de amortiguador de Tris, 100 mmol/l de cloruro de sodio, 1 mmol/l de disolución de cloruro de calcio, pH 7.4). El rendimiento de purificación de este proceso de purificación fue 3.7%, que fue alrededor de 1/10 del ejemplo 14.

20 Por otra parte, esta solicitud se basa en la solicitud provisional US nº 61/502426 presentada el 29 de junio de 2011.

Aplicabilidad industrial

25 De acuerdo con la presente invención, las impurezas pueden eliminarse rápidamente de una composición de proteína, y la antitrombina puede recuperarse eficazmente.

REIVINDICACIONES

1. Método para purificar antitrombina, que comprende las etapas de:
 - 5 (a) adsorber la antitrombina sobre el portador de intercambio aniónico,
 - (b) lavar con un amortiguador que contiene glicina para lavar y eliminar impurezas, y
 - 10 (c) eluir la antitrombina adsorbida sobre el portador de intercambio aniónico aumentando la concentración de sal o la conductividad del amortiguador o variando el pH del amortiguador,

en el que la antitrombina mantiene una relación de unión de ácido siálico de 70% o más, en el que la relación de unión de ácido siálico representa una relación del número medido de ácidos siálicos unidos al número máximo teórico de ácidos siálicos unidos en la proteína.
- 15 2. Método de purificación según la reivindicación 1, en el que se realiza una etapa adicional (d), que es un proceso de recuperación de un intervalo particular de fracciones del eluido para reducir las impurezas hasta el nivel deseado recuperando el intervalo particular de fracciones después de la elución de la proteína objetivo a partir del portador de intercambio aniónico.
- 20 3. Método de purificación según la reivindicación 1 o 2, en el que la recuperación de la antitrombina purificada es 50% o más.
- 25 4. Método de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además la purificación subsiguiente mediante unas combinaciones de métodos de purificación convencionales, proporcionando así una composición de antitrombina con una pureza elevada para utilización farmacéutica.
- 30 5. Método de purificación según la reivindicación 4, en el que los métodos de purificación convencionales adicionales incluyen unas combinaciones de una o más cromatografías que utilizan cualquier portador o membrana seleccionados de entre portadores de modo mixto, portadores de intercambio aniónico, portadores de intercambio catiónico, portadores de interacción hidrófoba, portadores de exclusión por tamaño, portadores de filtración en gel, portadores de fase inversa, portadores de hidroxiapatita, portadores de fluorapatita, portadores de celulosa sulfatada, portadores de agarosa sulfatada y similares o membranas.
- 35 6. Método de purificación según la reivindicación 5, en el que el portador de modo mixto presenta un grupo de intercambio iónico y un grupo de interacción hidrófoba.
- 40 7. Método de purificación según la reivindicación 5 o 6, en el que el portador de modo mixto se selecciona de entre Capto adhere, Capto MMC, HEA HyperCel, PPA HyperCel, MEP HyperCel, o TOYOPEARL MX-Trp-650M.

FIG.1

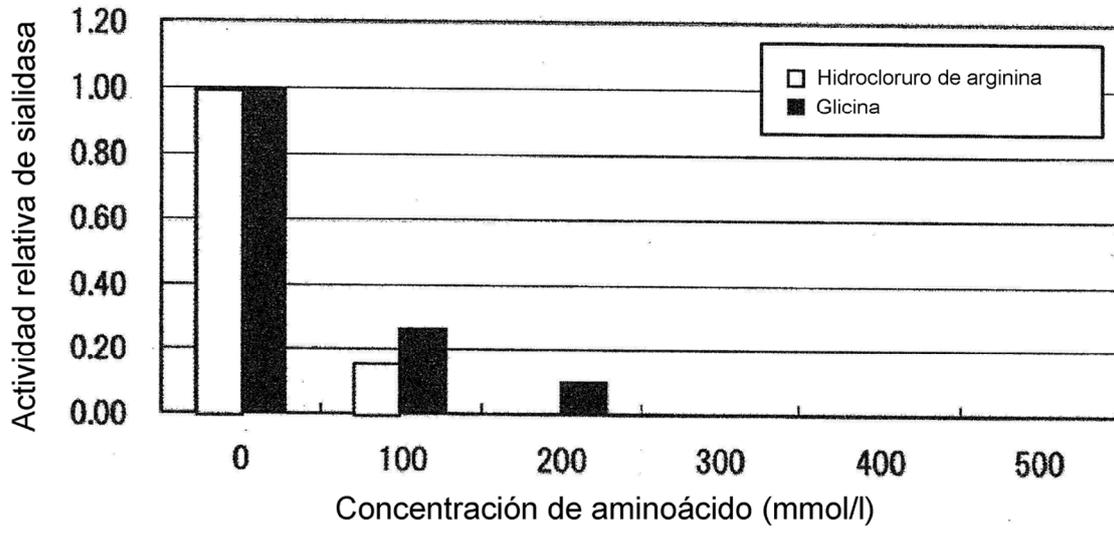


FIG.2

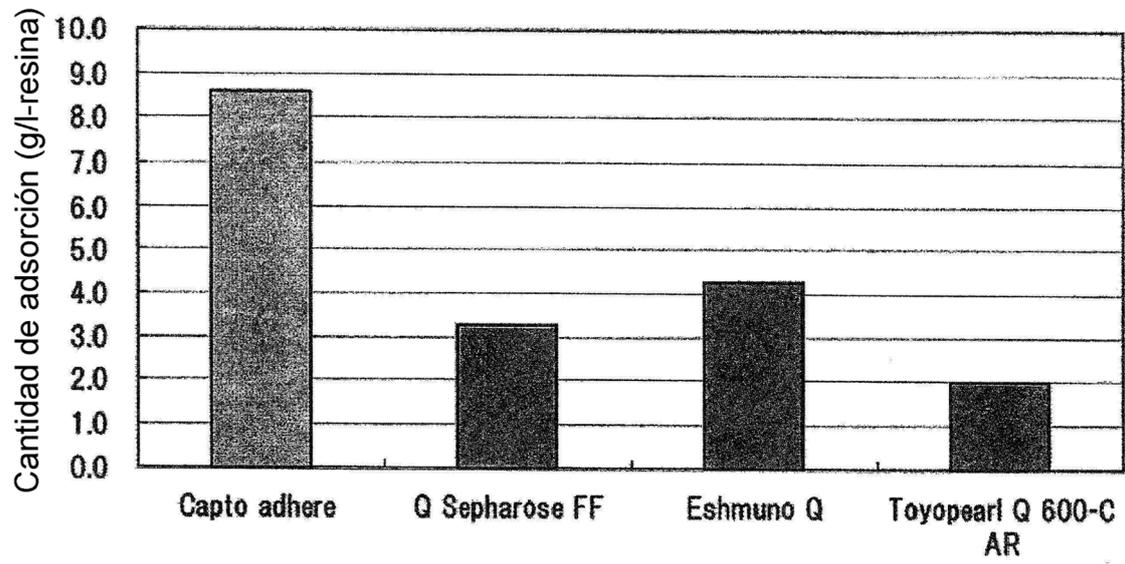


FIG.3

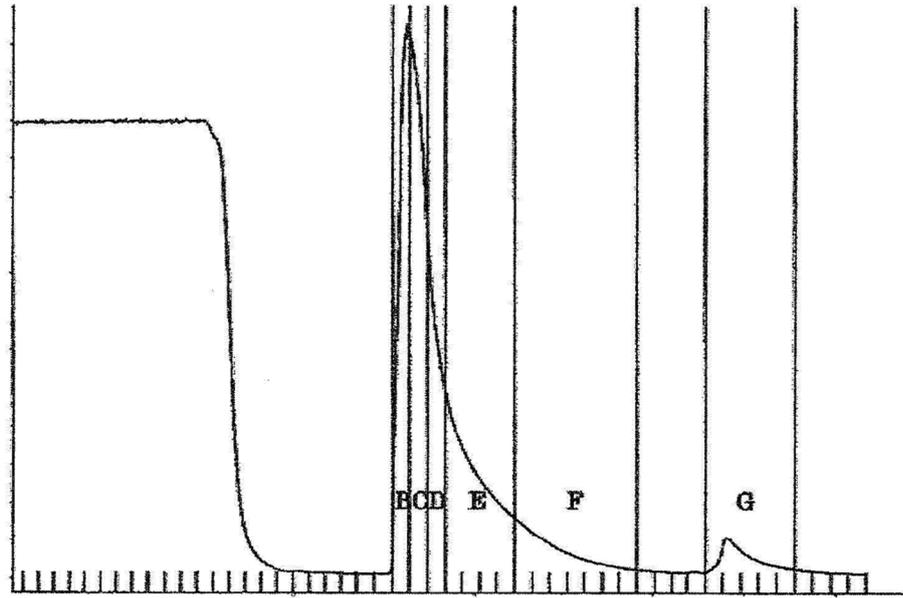


FIG.4

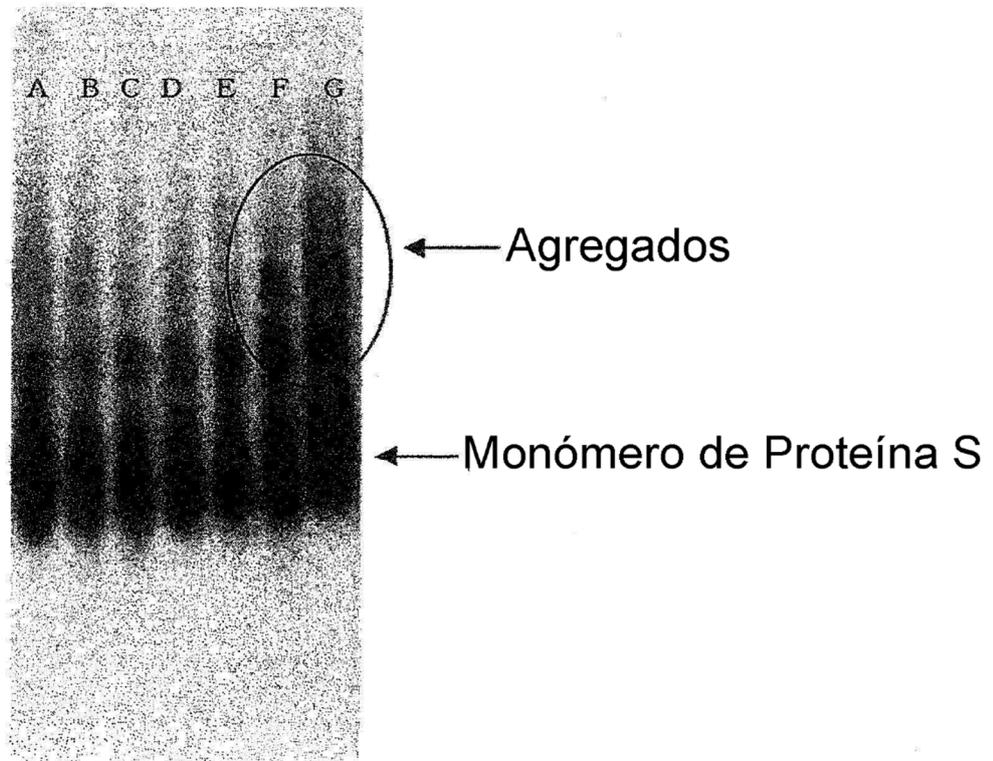


FIG.5

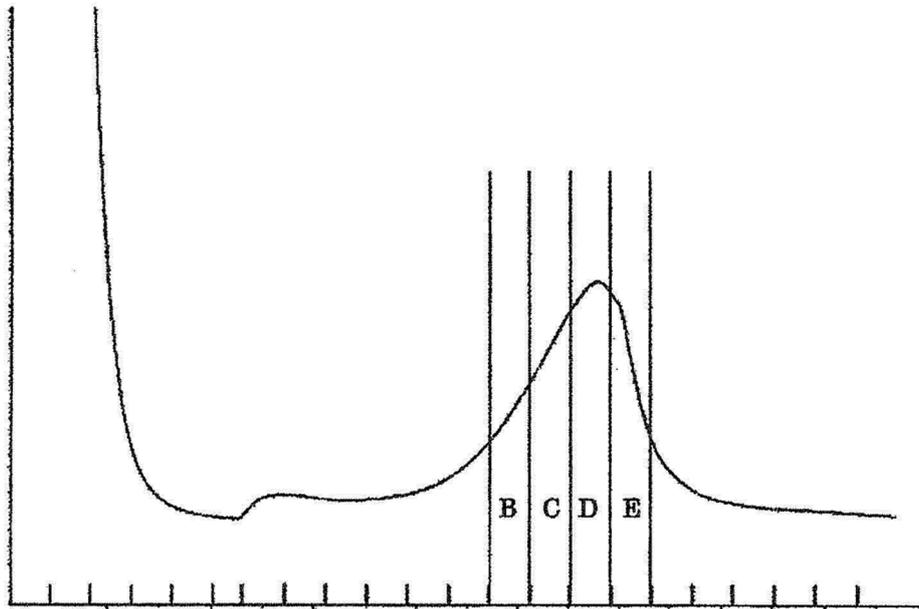


FIG.6

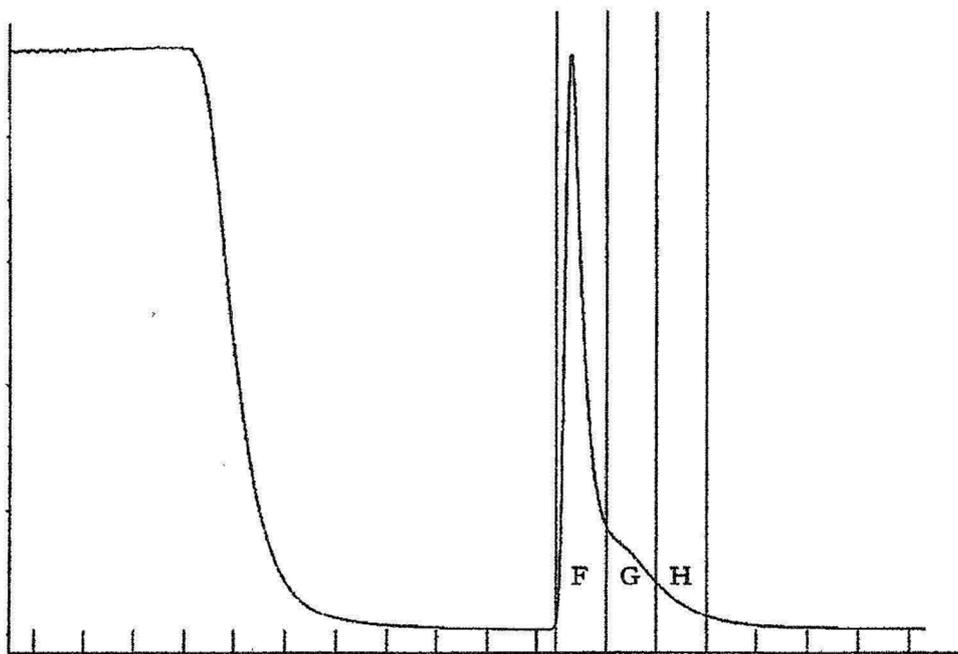


FIG.7

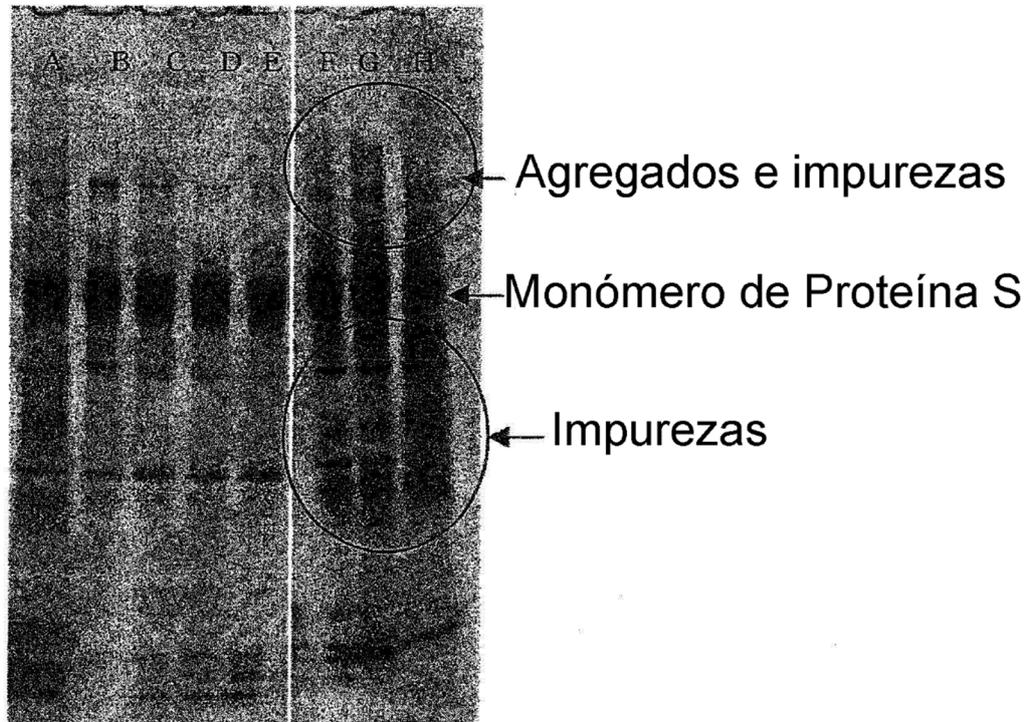


FIG.8

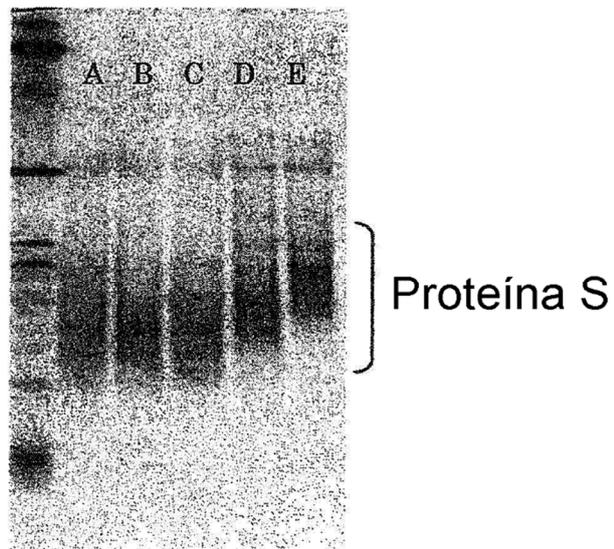


FIG.9

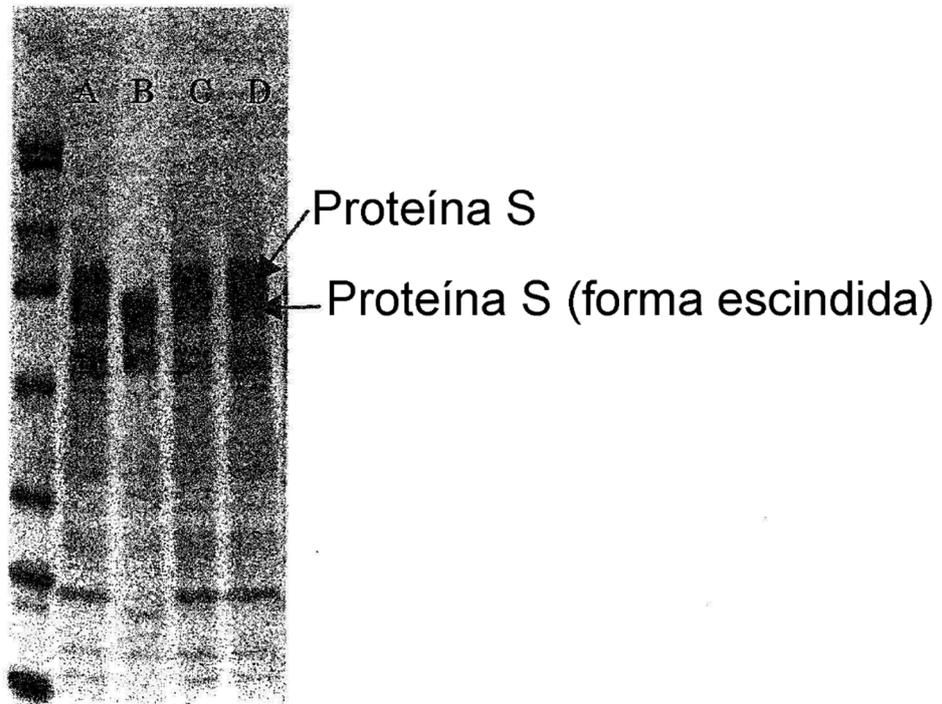


FIG.10

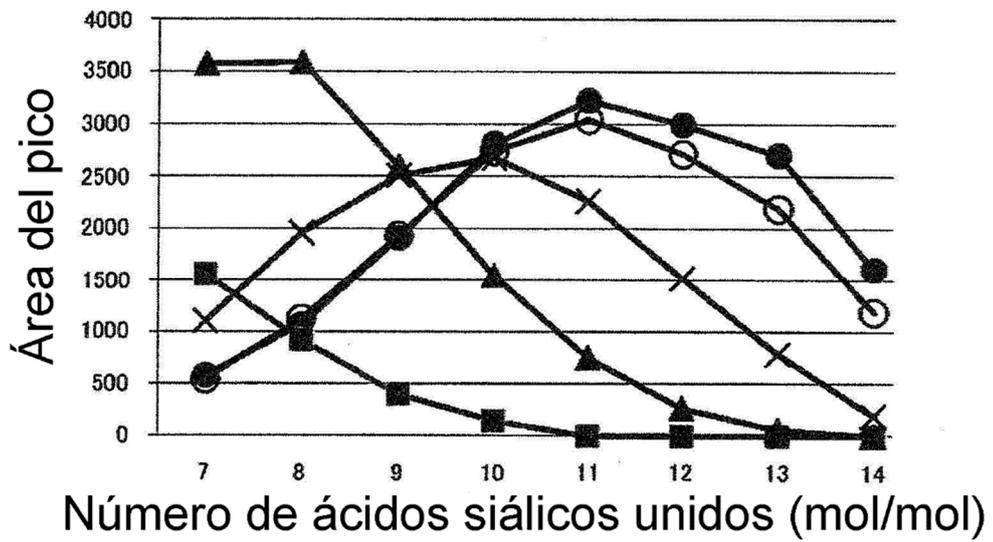


FIG.11

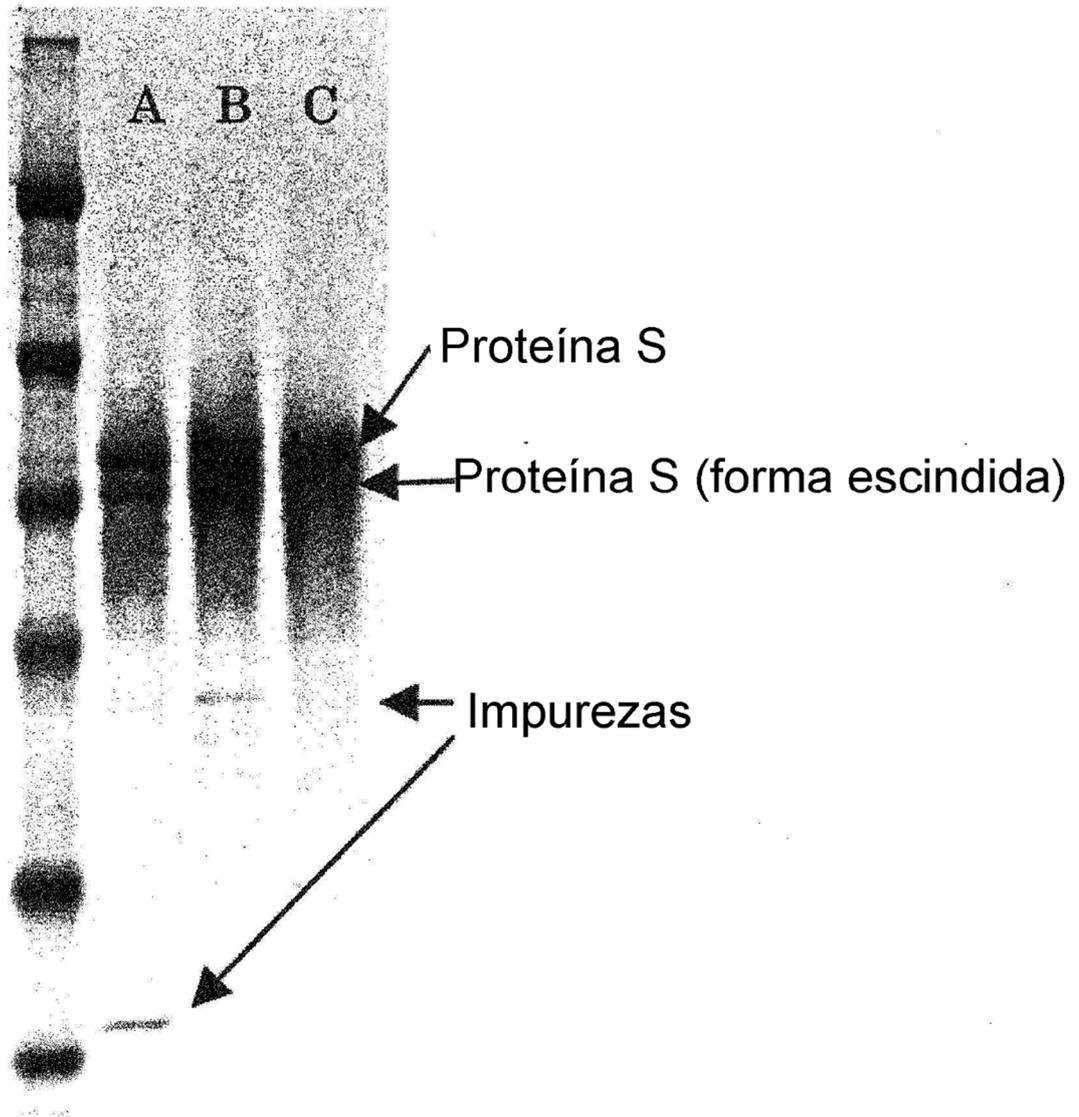


FIG.12

