

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 884**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**C07K 1/18** (2006.01)

**C12N 9/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2011 PCT/EP2011/056832**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2011 WO11135071**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2011 E 11716431 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 2563805**

54 Título: **Método de purificación para proteínas de unión a cationes divalentes sobre resina de intercambio aniónico**

30 Prioridad:

**29.04.2010 US 329487 P**

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

**29.10.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 790 884 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 de purificación para proteínas de unión a cationes divalentes sobre resina de intercambio aniónico

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para la purificación de proteínas de unión a cationes divalentes con alta pureza sobre un material de resina de intercambio aniónico, a proteínas de unión a cationes divalentes que pueden obtenerse mediante dicho método y a un kit que comprende medios para llevar a cabo dicho método.

10

**Antecedentes de la invención**

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

15

20

El concepto de elución de proteínas de unión a calcio a partir de resinas de intercambio aniónico mediante cationes divalentes se notificó por primera vez hace casi treinta años. Aunque se aisló con éxito el factor VII bovino a partir de plasma bovino, la purificación de factor VII humano aún era problemática, es decir el material producido sólo era parcialmente puro o se obtenía en tales pequeñas cantidades que se caracterizaba como actividad sin proteína detectable. Los trabajadores en el campo lograron el aislamiento de factor VII humano a partir de plasma humano en cantidades suficientes (con un rendimiento de aproximadamente el 30%) por medio de la adsorción de proteínas a un catión divalente, es decir citrato de bario, y la posterior separación de la proteína mediante cromatografía de intercambio aniónico. Además, había disponibles métodos para la recuperación y purificación de proteínas dependientes de la vitamina K a partir del medio de un cultivo celular que producía proteínas dependientes de la vitamina K con diferentes actividades específicas por medio de resinas de intercambio iónico convencionales, por ejemplo resinas de intercambio aniónico, y usando un eluyente que contiene cationes divalentes, por ejemplo ion de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ion de bario ( $\text{Ba}^{2+}$ ) e ion de estroncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ).

25

30

35

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

40

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

45

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

50

55

Los documentos WO 2007/026020, WO 96/40883 y US 20080207879 divulgan un kit que comprende una resina de intercambio aniónico, un tampón de carga libre de un catión divalente y un tampón de elución que contiene un catión divalente. Ninguno de estos documentos divulga un método con las etapas específicas de la presente invención.

60

Por tanto, el problema subyacente de la presente invención es proporcionar un método mejorada para la purificación de proteínas de unión a cationes divalentes con una alta pureza. La solución al problema técnica anterior se logra mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

65

**Sumario de la invención**

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

5 (a) cargar un material de resina de intercambio aniónico con la proteína de unión a cationes divalentes en un tampón de carga en ausencia de cationes divalentes, y opcionalmente lavar el material de resina de intercambio aniónico cargado con un tampón de lavado en ausencia de cationes divalentes; y

10 (b) eluir la proteína de unión a cationes divalentes con un eluyente que comprende al menos un catión divalente para formar un eluido que contiene la proteína de unión a cationes divalentes;

en el que el eluyente en la etapa (b) tiene un pH mayor que el pH del tampón de lavado en la etapa (a), o, en caso de no llevarse a cabo la etapa de lavado, del tampón de carga en la etapa (a), tal como se define adicionalmente en la reivindicación 1.

15 Además, la presente invención se refiere a proteínas de unión a cationes divalentes purificadas que pueden obtenerse mediante el método anterior, y a un kit que comprende medios para llevar a cabo el método anterior.

**Descripción detallada de la invención**

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

25 (a) cargar un material de resina de intercambio aniónico con la proteína de unión a cationes divalentes en un tampón de carga en ausencia de cationes divalentes, y opcionalmente lavar el material de resina de intercambio aniónico cargado con un tampón de lavado en ausencia de cationes divalentes; y

(b) eluir la proteína de unión a cationes divalentes con un eluyente que comprende al menos un catión divalente para formar un eluido que contiene la proteína de unión a cationes divalentes;

30 en el que el eluyente en la etapa (b) tiene un pH mayor que el pH del tampón de lavado en la etapa (a), o, en caso de no llevarse a cabo la etapa de lavado, del tampón de carga en la etapa (a), en el que el pH del eluyente en la etapa (b) es al menos 0,5 unidades de pH mayor que el pH del tampón de lavado en la etapa (a), o, en caso de no llevarse a cabo la etapa de lavado, del tampón de carga en la etapa (a).

35 El término "en ausencia de cationes divalentes", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la ausencia de cationes divalentes libres en el tampón, así como de cualesquiera cationes divalentes unidos a proteínas, en el que pueden estar presentes cationes divalentes que forman complejos con o mediante un quelante, por ejemplo, EDTA.

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

Las concentraciones de sal de las disoluciones y los tampones usados en la presente invención están normalmente en el intervalo de entre 20 y 200 mM, preferiblemente entre 100 y 150 mM.

60 Además, se conocen bien en la técnica tampones de carga adecuados para la carga de una proteína de unión a cationes divalentes a un material de intercambio aniónico en la etapa (a) del método de la presente invención, que proporcionan condiciones en las que la proteína de unión a cationes divalentes se une al material de intercambio aniónico. Por ejemplo, el tampón de carga puede tener un pH ≤ pH 7,4, preferiblemente ≤ pH 7,0, más preferiblemente ≤ pH 6,5, y lo más preferiblemente ≤ pH 6,0. Puede contener cualquier concentración de sal adecuada para la unión de la proteína de unión a cationes divalentes al material de resina de intercambio aniónico, que puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica. En una realización preferida, el tampón de carga

puede contener un agente quelante, por ejemplo EDTA, preferiblemente EDTA 2 mM. Un tampón de carga que contiene la proteína de unión a cationes divalentes que puede aplicarse al material de resina de intercambio aniónico en el método de la presente invención puede contener, por ejemplo, Tris 20 mM, NaCl 150 mM y EDTA 2 mM.

5 El método de la presente invención comprende opcionalmente la etapa de lavar el material de resina de intercambio aniónico cargado con un tampón de lavado en ausencia de cationes divalentes. Esta etapa de lavado puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica. Se conocen bien en la técnica tampones de lavado adecuados para eliminar por lavado las impurezas del material de intercambio aniónico esencialmente sin eluir la proteína de unión a cationes divalentes. Por ejemplo, el tampón de lavado puede tener un pH  $\leq$  pH 7,4, preferiblemente  $\leq$  pH 7,0, más preferiblemente  $\leq$  pH 6,5, y lo más preferiblemente  $\leq$  pH 6,0. Puede contener cualquier concentración de sal adecuada para el lavado del material de resina de intercambio aniónico sin eluir la proteína de unión a cationes divalentes en una cantidad significativa, que puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica. Por ejemplo, el tampón de lavado puede contener un agente de tamponamiento adecuado como por ejemplo Tris o MES, preferiblemente Tris 20 mM o MES 20 mM. Adicionalmente, puede contener un agente quelante como por ejemplo EDTA, preferiblemente EDTA 2 mM. Además, puede contener una sal adecuada para la regulación de la conductividad del tampón de lavado, como por ejemplo NaCl, que puede estar presente en una concentración de  $\leq$  200 mM, preferiblemente desde 100 mM hasta 200 mM, más preferiblemente desde 150 mM hasta 200 mM, más preferiblemente desde 170 mM hasta 190 mM, y lo más preferiblemente desde 175 mM hasta 185 mM. En otra realización preferida de la presente solicitud, el tampón de lavado contiene desde 100 hasta 200 mM de NaCl. El valor absoluto para la concentración de sal depende de la proteína de unión a cationes divalentes que va a purificarse, encontrándose dentro del conocimiento del experto en la técnica determinar qué proteínas de unión a cationes divalentes requieren menores o mayores concentraciones de sal para conseguir la pureza óptima.

25 Adicionalmente, el método de la presente invención puede comprender además al menos una etapa de lavado adicional después de la etapa (a) y antes de la etapa (b), en el que la conductividad del tampón de lavado adicional es igual a o menor que la conductividad del eluyente. Esta etapa de lavado adicional se lleva a cabo en ausencia de cationes divalentes. En una realización, el tampón de lavado adicional tiene un pH de 7,4. El tampón de lavado adicional puede contener cualquier concentración de sal adecuada conocida por un experto en la técnica. Además, el tampón de lavado adicional puede contener un agente de tamponamiento como por ejemplo Tris, preferiblemente Tris 20 mM, HEPES, Tris/acetato, histidina, Gly-Gly, MOPS o tricina a concentraciones típicas de 5 a 50 mM, y puede contener un contraión, como por ejemplo Cl<sup>-</sup>, a una concentración que proporciona una conductividad menor que el tampón de elución. En una realización preferida de la presente invención, el tampón de lavado adicional tiene una concentración de sal menor que el eluyente. En otra realización preferida, el tampón de lavado adicional contiene un agente quelante como por ejemplo EDTA, preferiblemente EDTA 2 mM.

35 La elución de la proteína de unión a cationes divalentes con un eluyente que comprende al menos un catión divalente para formar un eluido que contiene la proteína de unión a cationes divalentes puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica. Sin embargo, según la presente invención, el eluyente en la etapa (b) tiene un pH mayor que el pH del tampón de lavado en la etapa (a), o, en caso de no llevarse a cabo la etapa de lavado, del tampón de carga en la etapa (a). Preferiblemente, el eluyente tiene un pH  $\geq$  7,4, más preferiblemente  $\geq$  8,0, y el tampón de lavado en la etapa (a), o, en caso de no llevarse a cabo la etapa de lavado, el tampón de carga en la etapa (a), tiene un pH de  $\leq$  7,4, más preferiblemente  $\leq$  7,0, más preferiblemente  $\leq$  6,5, y lo más preferiblemente  $\leq$  6,0, siempre que el pH del eluyente en la etapa (b) sea mayor que el pH del tampón de lavado en la etapa (a), o, en caso de no llevarse a cabo la etapa de lavado, del tampón de carga en la etapa (a). El pH del eluyente en la etapa (b) es al menos 0,5 unidades de pH, preferiblemente 1,0 unidades de pH, más preferiblemente al menos 1,5 unidades de pH, lo más preferiblemente al menos 2,0 unidades de pH mayor que el pH del tampón de lavado en la etapa (a), o, en caso de no llevarse a cabo la etapa de lavado, del tampón de carga en la etapa (a).

50 Tal como se usa en el presente documento, el eluyente puede contener cualquier concentración de sal adecuada para la elución de la proteína de unión a cationes divalentes del material de resina de intercambio aniónico sin eluir impurezas en una cantidad significativa, que puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica. Por ejemplo, puede contener un agente de tamponamiento adecuado como por ejemplo Tris, preferiblemente Tris 20 mM, HEPES, Tris/acetato, histidina, Gly-Gly, MOPS o tricina, a concentraciones que oscilan normalmente desde 5 hasta 50 mM. También puede contener una sal adecuada para la regulación de la conductividad del tampón de lavado, como por ejemplo NaCl, que puede estar presente en una concentración de  $\geq$  150 mM, más preferiblemente  $\geq$  180 mM, y lo más preferiblemente  $\geq$  195 mM. En una realización preferida de la presente invención, la conductividad de todos los tampones usados en el método de la presente invención es aproximadamente la misma. En otra realización preferida, el tampón de lavado en la etapa (a), o, en caso de no llevarse a cabo la etapa de lavado, el tampón de carga en la etapa (a), tiene una conductividad que es igual a o menor que la conductividad del eluyente en la etapa (b).

65 El eluyente según la presente invención contiene además al menos un catión divalente. En una realización preferida, el eluyente comprende un catión divalente, seleccionado del grupo que consiste en Ca<sup>2+</sup>, Be<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>, o combinaciones de los mismos. El catión está presente preferiblemente en el eluyente en una concentración de desde 1 mM hasta 20 mM, más preferiblemente en una concentración de 2 mM. El catión

está presente en el eluyente en forma de una sal adecuada con un anión. El experto en la técnica conoce aniones adecuados y comprenden, por ejemplo, aniones a base de sulfato, fosfato, carbonato y borato, o combinaciones de los mismos. La sal que comprende el catión divalente puede estar presente en el eluyente en una concentración de desde 1 mM hasta 20 mM, preferiblemente 2 mM. En una realización preferida, la sal es  $\text{CaCl}_2$ . En una realización particularmente preferida, el eluyente contiene  $\text{CaCl}_2$  2 mM. En realizaciones preferidas adicionales, el eluyente contiene  $\text{Ca}^{2+}$  2 mM y tiene un pH que es al menos 0,5 unidades de pH, preferiblemente al menos 1,0 unidades de pH, más preferiblemente al menos 1,5 unidades de pH, lo más preferiblemente al menos 2,0 unidades de pH mayor que el pH del tampón de lavado en la etapa (a), o, en caso de no llevarse a cabo la etapa de lavado, del tampón de carga en la etapa (a).

Tal como se usa en el presente documento, el término "material de resina de intercambio aniónico" no subyace a ninguna restricción específica. Según la presente invención, la resina incluye cualquier material adecuado para cromatografía de intercambio aniónico conocido en la técnica, como por ejemplo un material de cromatografía a base de agarosa, por ejemplo sefarosas como Fast Flow o Cpto, material sintético polimérico, por ejemplo polimetacrilato como Toyopearl, poliestireno/divinilbenceno, por ejemplo Poros, Source, o celulosa, por ejemplo Cellufine. En un ejemplo específico de la presente invención, el material de resina de intercambio aniónico es sefarosa, que se basa en agarosa modificada, cuyas cadenas de polisacárido se reticularan para formar una red tridimensional. En una realización preferida, el material de resina de intercambio aniónico incluye, pero no se limita a, una resina que porta una amina primaria como ligando, por ejemplo sefarosa de aminohexilo, sefarosa de benzamidina, sefarosa de lisina o sefarosa de arginina. En otra realización preferida, el material de resina de intercambio aniónico incluye, pero no se limita a, una resina que tiene un resto cargado positivamente a pH neutro, tal como alquilaminoetano, como dietilaminoetano (DEAE), dimetilaminoetano (DMAE) o trimetilaminoetilo (TMAE), polietilimina (PEI), aminoalquilo cuaternario, aminoetano cuaternario (QAE), amonio cuaternario (Q), y similares. En una realización particularmente preferida, el material de resina de intercambio aniónico es Q-Sepharose Fast Flow (Q-Sepharose FF).

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

La proteína de unión a cationes divalentes puede obtenerse usando métodos conocidos por el experto en la técnica, como por ejemplo proteínas derivadas de plasma, proteínas producidas de manera transgénica o proteínas producidas de manera recombinante, por ejemplo usando células CHO. Un experto en la técnica conoce métodos secretores y no secretores para extraer proteínas de cultivo celular. Esto puede incluir cualquier método conocido en la técnica para (i) la producción de ADN recombinante mediante ingeniería genética, por ejemplo mediante transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN, (ii) la introducción de ADN recombinante en células procariotas o eucariotas mediante transfección, por ejemplo mediante electroporación o microinyección, (iii) el cultivo de dichas células transformadas, por ejemplo de manera continua o discontinua, (iv) la expresión de una proteína de unión a cationes divalentes, por ejemplo constitutiva o tras inducción, y (v) el aislamiento de la proteína, por ejemplo del medio de cultivo o cosechando las células transformadas, con el fin de obtener una proteína de unión a cationes divalentes en bruto. Adicionalmente, el ADN recombinante que codifica para una proteína de unión a cationes divalentes, por ejemplo un plásmido, también puede contener una secuencia de ADN que codifica para un marcador seleccionable para seleccionar las células que se han transfectado con éxito con el ADN recombinante.

Las proteínas pueden purificarse previamente para reducir impurezas, por ejemplo mediante electroforesis en gel, cromatografía, filtración en gel, centrifugación, filtración, precipitación, cristalización o cualquier otro método conocido en la técnica. El término "impureza" tal como se usa en el presente documento incluye cualquier impureza procedente de la producción de la proteína de unión a cationes divalentes, y puede incluir, por ejemplo, impurezas proteicas de célula huésped, impurezas de ácido nucleico, impurezas de polipéptido, impurezas de tampón y sal, impurezas procedentes del medio de cultivo celular, impurezas relacionadas con el producto, tales como dímeros o fragmentos, y combinaciones de los mismos.

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

Además, en otro aspecto de la presente invención, se proporciona una proteína de unión a cationes divalentes purificada que puede obtenerse mediante el método de la presente invención, así como un kit que comprende medios para llevar a cabo el método de la presente invención. En particular, la presente invención se refiere a un kit que comprende un eluyente que comprende al menos un catión divalente, adecuado para eluir una proteína de

unión a cationes divalentes de un material de resina de intercambio aniónico en un tampón, en el que el pH del eluyente es mayor que el pH del tampón. Por ejemplo, el kit puede contener un tampón de carga y/o un eluyente y/o un tampón de lavado y/o un tampón de lavado adicional que son adecuados para la purificación de una proteína de unión a cationes divalentes usando un material de resina de intercambio aniónico según la presente invención. En una realización preferida, el tampón de carga, los tampones de lavado y/o el eluyente son tal como se definieron anteriormente. Además, el kit de la presente invención puede contener un material de resina de intercambio aniónico adecuado.

La presente invención se refiere además al uso del método de la presente invención tal como se definió anteriormente y/o del kit de la presente invención tal como se definió anteriormente para la purificación de una proteína de unión a cationes divalentes,

La presente invención proporciona un método eficaz para la purificación de una proteína de unión a cationes divalentes usando un material de resina de intercambio aniónico que permite, simultáneamente, una alta reducción de impurezas relacionadas con el procedimiento de la proteína con altos rendimiento de producto.

En particular, el método de la presente invención se basa en los siguientes principios. En general, la unión de proteínas a materiales de resina de intercambio aniónico se aumenta a menores conductividades y mayores valores de pH. Por el contrario, la unión de proteínas a materiales de resina de intercambio aniónico se disminuye a mayores conductividades y menores valores de pH. En el método de la presente invención, la proteína de unión a cationes divalentes se carga y/o lava preferiblemente a un pH bajo que todavía permite la unión de la proteína de unión a cationes divalentes al material de intercambio aniónico y no perjudica la integridad estructural o la actividad de la proteína de unión a cationes divalentes. En tales condiciones, muchas impurezas proteicas, en particular aquellas que tienen un punto isoeléctrico (pI) mayor que las proteínas de unión a cationes divalentes, no se unen al material de resina de intercambio aniónico y, por tanto, se reduce en gran medida la unión de impurezas al material de resina de intercambio aniónico. Las impurezas proteicas que no se unen al material de resina de intercambio aniónico en estas condiciones, es decir impurezas proteicas que tienen un pI bajo, no se eluirán conjuntamente con la proteína de unión a cationes divalentes dado que el aumento del pH en el tampón de elución provoca que todas las proteínas, incluyendo la proteína de unión a cationes divalentes, se unan incluso más fuerte al material de resina de intercambio aniónico. Según el método de la presente invención, sólo la proteína de unión a cationes divalentes se eluye específicamente en tales condiciones de elución debido a los cationes divalentes presentes en el tampón de elución. En este contexto, cabe destacar que la elución de un material de resina de intercambio aniónico a valores de pH aumentados es muy atípica dado que, tal como se ha indicado anteriormente, las proteínas se unen generalmente más fuerte a materiales de resina de intercambio aniónico a mayores valores de pH. Eluyendo específicamente las proteínas de unión a cationes divalentes con un eluyente que comprende al menos un catión divalente en las condiciones anteriores, el método de la presente invención logra sorprendente y ventajosamente puridades superiores del producto de proteína de unión a cationes divalentes con una sola etapa de purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico.

En particular, la presente invención modifica ventajosamente la carga superficial de las proteínas que van a purificarse aumentando el pH entre la etapa de carga y/o la etapa de lavado de la etapa (a) del método de la presente invención, y la etapa de elución de la proteína de unión a cationes divalentes. Un pH aumentado en la etapa de elución obliga a las impurezas a permanecer adsorbidas al material de resina de intercambio aniónico mientras se lleva a cabo la elución específica de la proteína que va a purificarse con cationes divalentes a un pH alto. En particular, un pH alto es normalmente una condición desfavorable para llevar a cabo la elución de un material de resina de intercambio aniónico, dado que las proteínas se unen más fuerte a un material de resina de intercambio aniónico a mayores valores de pH. Sin embargo, según la presente invención, las condiciones anteriores dan como resultado una alta pureza así como altos rendimientos de proteínas de unión a cationes divalentes. El método de la presente invención puede proporcionar una reducción significativa de impurezas de polipéptido relacionadas con el procedimiento, por ejemplo, cargando la disolución de proteína a pH neutro sobre un material de resina de intercambio aniónico, aplicando una etapa de lavado a pH reducido y eluyendo el producto a un pH aumentado en presencia de un catión divalente. En lugar del lavado a pH bajo, la muestra ya puede cargarse a un pH bajo seguido de elución a pH aumentado en presencia de un catión divalente.

Diversas modificaciones y variaciones del método descrito y los productos de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la invención. Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones preferidas específicas, no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones.

#### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: SDS-PAGE de fracciones obtenidas después de la purificación de anexina V en dispositivo Q-Sepharose Fast Flow. El análisis de SDS-PAGE se llevó a cabo en un gel al 12% en condiciones reductoras. La carga, la columna, el flujo a través, el lavado y las fracciones de elución A2 a A8 se analizaron mediante un método de electroforesis en gel y los polipéptidos separados se visualizaron mediante tinción con plata (tinción de proteína total) o inmunotransferencia de tipo Western (WB, *Western blotting*) usando anticuerpos específicos anti-anexina. La anexina V es un polipéptido de cadena sencilla con aproximadamente 36 kDa y puede unirse a hasta 10 moléculas

de catión divalente en tres tipos diferentes de sitios de unión. La posición de la banda de anexina V se indica con una flecha.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan como guía para un experto en la técnica. Los ejemplos no deben interpretarse como limitativos de la invención, los ejemplos proporcionan simplemente una metodología específica útil en la comprensión y práctica de una realización de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones.

#### Ejemplo 1: Purificación de rFIX en Q-Sepharose FF

Se activó una resina de Q-Sepharose Fast Flow con 2 volúmenes de columna (CV) de NaCl 2 M y se equilibró con 4 CV de un tampón de equilibrado (Tris 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4, conductividad de aproximadamente 2 mS/cm). Después de eso, se cargó un sobrenadante de cultivo celular filtrado que contenía FIX obtenido a partir de una línea de células CHO modificadas por ingeniería genética complementado con EDTA 3 mM sobre la columna a una velocidad de flujo lineal de aproximadamente 150 cm/h que tenía una conductividad de aproximadamente de 13 a 15 mS/cm. Luego se lavó la columna con 2 CV de tampón de equilibrado seguido de un segundo lavado con 5 CV de tampón de lavado (MES 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 175 mM, pH 6,0) para retirar la mayor parte de impurezas proteicas que no se unen sobre el material de resina de intercambio aniónico a pH 6,0. Antes de la elución, se redujo de nuevo la conductividad en la columna aplicando un lavado con 2 CV de tampón de equilibrado. Se eluyó el FIX unido con 5 CV del eluyente (Tris 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, NaCl 180 mM, pH 8,0). Los resultados en la tabla 1 muestran que aplicando este procedimiento, pudo obtenerse el producto de proteína de unión a cationes divalentes con una pureza del 98% con una sola etapa de purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico fuera de la matriz del sobrenadante de cultivo celular.

Tabla 1: Purificación de rFIX en Q-Sepharose FF

	Antígeno de FIX	Proteína CHO	Pureza de FIX	Nivel de impurezas de CHO
	µg/ml	µg/ml	%	ng de CHO/µg de antígeno de FIX
Carga	6,2	13,4	32	2161
Combinación de eluido	105,3	2,43	98	23,1

#### Ejemplo 2: Purificación de FVII en Q-Sepharose FF

Se activó una resina de Q-Sepharose Fast Flow con 2 CV de NaCl 2 M y se equilibró con 5 CV de un tampón de equilibrado (Tris 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5, conductividad de aproximadamente 2 mS/cm). Después de eso, se cargó un sobrenadante de cultivo celular filtrado que contenía FVII obtenido a partir de una línea de células CHO modificadas por ingeniería genética complementado con EDTA 9 mM sobre la columna a una velocidad de flujo lineal de aproximadamente 46 cm/h que tenía una conductividad de aproximadamente 16 mS/cm. Luego se lavó la columna con 4 CV de tampón de equilibrado seguido de un segundo lavado con 5 CV de tampón de lavado (MES 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 170 mM, pH 6,0) para retirar la mayor parte de impurezas proteicas que no se unen sobre el material de resina de intercambio aniónico a pH 6,0. Antes de la elución, se redujo de nuevo la conductividad en la columna aplicando un lavado con 2 CV de tampón de equilibrado. Se eluyó el FIX unido con 5 volúmenes de columna del eluyente (Tris 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, NaCl 180 mM, pH 8,0). Los resultados en la tabla 2 muestran que aplicando este procedimiento, pudo obtenerse el producto de unión a cationes divalentes con una pureza del 97% con una sola etapa de purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico fuera de la matriz del sobrenadante de cultivo celular.

Tabla 2: Purificación de rFVII en Q-Sepharose FF

	Antígeno de FVII	Proteína CHO	Pureza de FVII	Nivel de impurezas de CHO
	µg/ml	µg/ml	%	ng de CHO/µg de antígeno de FVII
Carga	7,4	26,3	22	3554
Combinación de eluido	13,0	0,43	97	30

#### Ejemplo 3: Purificación de anexina V humana en Q-Sepharose FF

Se activó una resina de Q-Sepharose Fast Flow con 4 CV de NaCl 2 M y se equilibró con 15 CV de un tampón de

5 equilibrado (Tris 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5, conductividad de aproximadamente 2 mS/cm). Después de eso, a una  
 preparación de proteína anexina V purificada a partir de placenta humana se le añadió una disolución madre de  
 proteínas obtenida a partir de una línea de células CHO para generar una carga de proteínas con una pureza de  
 anexina de por debajo del 20%. Se complementó la mezcla de proteínas que contenía anexina con EDTA 1 mM y se  
 10 cargó sobre la columna a una velocidad de flujo lineal de aproximadamente 23 cm/h que tenía una conductividad de  
 aproximadamente 4 mS/cm. Luego se lavó la columna con 10 CV de tampón de equilibrado seguido de un segundo  
 lavado con 10 CV de tampón de lavado (MES 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 155 mM, pH 6,0) para retirar la mayor parte  
 de impurezas proteicas que no se unen sobre el material de resina de intercambio aniónico a pH 6,0. Antes de la  
 15 elución, se redujo de nuevo la conductividad en la columna aplicando un lavado con 10 CV de tampón de  
 equilibrado. Se eluyó la anexina unida con 30 CV del eluyente (Tris 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0). El  
 tampón de elución tenía la misma conductividad que el tampón de lavado. Se analizaron las fracciones resultantes  
 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS en un gel al 12% en condiciones reductoras. Los geles con los  
 polipéptidos separados teñidos para determinar la proteína total (tinción con plata) y anexina V (inmunotransferencia  
 de tipo Western (WB) con anticuerpos anti-anexina) se representan en la figura 1. Los resultados muestran que en  
 las fracciones de elución A2 a A4, la anexina V está contenida en una alta pureza en comparación con la mezcla de  
 20 proteínas que se cargó sobre la columna (carga de fracción). Los datos indican que después de una sola etapa de  
 purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico, pudo obtenerse la proteína de unión a cationes  
 divalentes con un alta pureza en las fracciones de elución.

20 Ejemplo 4:

Se sometieron a prueba diversas condiciones para la purificación de FIX a partir de proteínas de la célula huésped  
 (HCP) usando Q-Sepharose Fast Flow. En particular, el procedimiento incluía las siguientes condiciones:

25 Desarrollo 1: carga a pH neutro, lavado a pH bajo de 6,5, elución a pH alto de 7,9, conductividad en tampón de  
 lavado y de elución siendo igual.

Desarrollo 2: carga a pH neutro, lavado a pH bajo de 6,0, elución a pH alto de 8,0, conductividad en tampón de  
 lavado siendo menor que en tampón de elución.

30 Desarrollo 2.1: igual que el desarrollo 2, concentración de sal aumentada en el lavado.

En todos los experimentos se realizó un segundo lavado inmediatamente antes de la elución con un tampón de baja  
 conductividad. En todos los experimentos la conductividad del tampón de elución es mayor que el tampón de carga.  
 35 Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

	Carga	Lavado 1	Lavado 2	Elución	Observación	Pureza del combinación de eluido		Factor de reducción de CHO	
						ng de HCP/ $\mu$ g de FIX	reducción de impureza espec.	$\mu$ g de carga/ $\mu$ g de combinación de eluido	
desarrollo 1	Tris 20 mM, NaCl aprox. 150 mM, EDTA 2 mM, pH=7,4	MES 20 mM, NaCl 160 mM, EDTA 2 mM, pH=6,5	Tris 20 mM, pH=7,4	Tris 20 mM, NaCl 180 mM, CaCl <sub>2</sub> 2 mM, pH=7,9	Lavado a pH bajo, tampón de elución a pH alto conductividad en tampón de lavado y de elución siendo igual	21	56	175	
desarrollo 2	Tris 20 mM, NaCl aprox. 150 mM, EDTA 2 mM, pH=7,4	MES 20 mM, NaCl 165 mM, EDTA 2 mM, pH=6,0	Tris 20 mM, pH=7,4	Tris 20 mM, NaCl 180 mM, CaCl <sub>2</sub> 2 mM, pH=8,0	Lavado a pH bajo, tampón de elución a pH alto conductividad en tampón de lavado siendo menor que en tampón de elución	28	81	195	
desarrollo 2.1	Tris 20 mM, NaCl aprox. 150 mM, EDTA 2 mM, pH=7,4	MES 20 mM, NaCl 175 mM, EDTA 2 mM, pH=6,0	Tris 20 mM, pH=7,4	Tris 20 mM, NaCl 180 mM, CaCl <sub>2</sub> 2 mM, pH=8,0	Lavado a pH bajo, tampón de elución a pH alto conductividad en tampón de lavado siendo menor que en tampón de elución	23	94	143	

Ejemplo 5: Purificación comparativa de rFIX en Q-Sepharose FF

5 Con el fin de demostrar los efectos beneficiosos del método de la presente invención, se realizaron dos desarrollos cromatográficos comparativos. En particular, se purificó rFIX a partir de un sobrenadante de cultivo de células CHO clarificado en Q-Sepharose FF, en el que el desarrollo 1 se realizó según el método de la presente invención, es decir el pH del eluyente en la etapa (b) tenía un pH mayor que el pH del tampón de lavado en la etapa (a), y el desarrollo 2 se realizó de la misma manera pero sin ninguna diferencia de pH entre carga/lavado en la etapa (a) y elución en la etapa (b). Las condiciones de los tampones respectivos se resumen en la tabla 4.

10

Tabla 4: Condiciones de los tampones de dos desarrollos cromatográficos de purificación de rFIX

	pH		Ca <sup>2+</sup>
	Desarrollo 1	Desarrollo 2	
Carga	6,0	7,6	ausente, EDTA 2 mM
Lavado 1	6,0	7,6	ausente, EDTA 2 mM
Lavado 2	7,6	7,6	ausente, EDTA 2 mM
Elución	7,6	7,6	presente

15 Se analizaron las fracciones obtenidas para determinar el rendimiento de la actividad de rFIX, el rendimiento del antígeno de rFIX, el factor de reducción de proteínas de la célula huésped CHO (CHO HCP) y la actividad específica de rFIX. El factor de reducción de CHO HCP se calculó como la razón de CHO HCO totales cargadas con respecto a CHO HCP encontradas en el eluido. Los datos respectivos se resumen en la tabla 5.

20 Tabla 5. Resultados de dos desarrollos cromatográficos de purificación de rFIX

20

	Rendimiento de la actividad de rFIX [%]	Rendimiento del antígeno de rFIX [%]	Factor de reducción de CHO HCP	Actividad espec. de rFIX [U/mg de rFIX]
Desarrollo 1	88	33	239	266
Desarrollo 2	95	36	112	134

25 Estos resultados indican que el método de la presente invención, en particular el cambio de pH entre carga/lavado y elución, puede mejorar significativamente la reducción de proteínas de la célula huésped contaminantes y la actividad específica de la proteína purificada.

25

**REIVINDICACIONES**

1. Método para la purificación de una proteína de unión a cationes divalentes que comprende las etapas de:
  - 5 a) cargar un material de resina de intercambio aniónico con la proteína de unión a cationes divalentes en un tampón de carga en ausencia de cationes divalentes, y opcionalmente lavar el material de resina de intercambio aniónico cargado con un tampón de lavado en ausencia de cationes divalentes; y
  - 10 b) eluir la proteína de unión a cationes divalentes con un eluyente que comprende al menos un catión divalente para formar un eluido que contiene la proteína de unión a cationes divalentes;
 

en el que el eluyente en la etapa (b) tiene un pH mayor que el pH del tampón de lavado en la etapa (a), o, en caso de no llevarse a cabo la etapa de lavado, del tampón de carga en la etapa (a), en el que el pH del eluyente en la etapa (b) es al menos 0,5 unidades de pH mayor que el pH del tampón de lavado en la etapa (a), o, en caso de no llevarse a cabo la etapa de lavado, del tampón de carga en la etapa (a).
- 20 2. Método según la reivindicación 1, en el que el tampón de lavado en la etapa (a), o, en caso de no llevarse a cabo la etapa de lavado, el tampón de carga en la etapa (a), tiene una conductividad que es igual a o menor que la conductividad del eluyente en la etapa (b).
- 25 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el al menos un catión divalente en la etapa (b) se selecciona del grupo que consiste en  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Be}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , o combinaciones de los mismos.
- 30 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el material de resina de intercambio aniónico tiene un grupo cargado positivamente que se selecciona del grupo que consiste en dietilaminoetano (DEAE), dimetilaminoetano (DMAE), trimetilaminoetilo (TMAE), polietilenimina (PEI), aminoalquilo cuaternario, aminoetano cuaternario (QAE) y amonio cuaternario (Q).
- 35 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el material de resina de intercambio aniónico porta una amina primaria como ligando que se selecciona del grupo que consiste en aminohexilo, benzamidina, lisina y arginina.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la proteína de unión a cationes divalentes es una proteína de unión a calcio.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la proteína de unión a cationes divalentes es una proteína dependiente de la vitamina K.
- 40 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la proteína de unión a cationes divalentes se selecciona del grupo que consiste en factor IX, factor VII y anexina V.

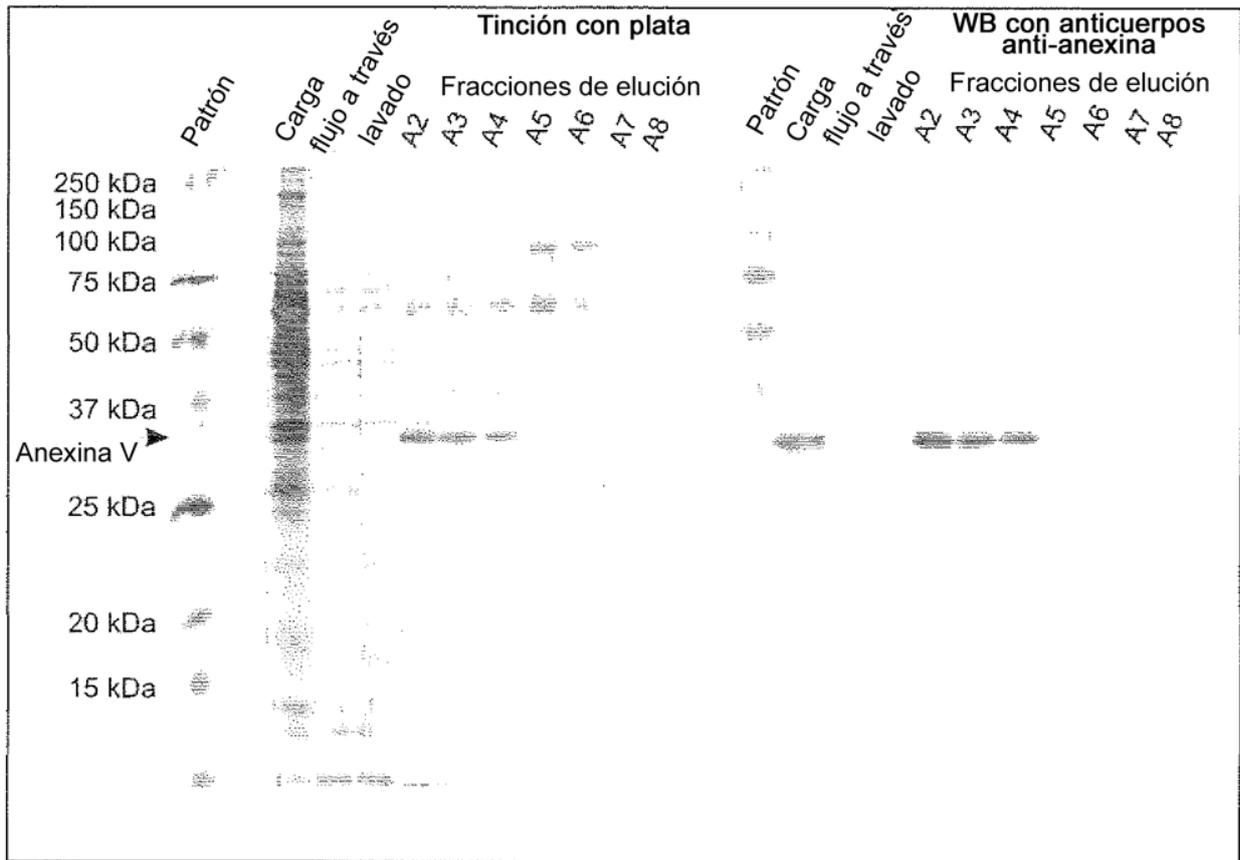


Fig. 1