

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 454 566**

51 Int. Cl.:

C07K 14/81 (2006.01)

C07K 14/76 (2006.01)

C07K 14/75 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2005 E 05746285 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 1765866**

54 Título: **Aislamiento de proteínas de plasma o suero**

30 Prioridad:

07.06.2004 DK 200400891

05.07.2004 DK 200401062

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

10.04.2014

73 Titular/es:

THERAPURE BIOPHARMA INC. (100.0%)

2585 Meadowpine Blvd

Mississauga ON L5N 8H9 , CA

72 Inventor/es:

LIHME, ALLAN, OTTO, FOG

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 454 566 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

Aislamiento de proteínas de plasma o suero

5 CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere al fraccionamiento y aislamiento a gran escala de proteína(s), tal como proteína(s) de plasma o suero humano, a partir de una solución de proteína. En particular, la presente invención se refiere a una fabricación a gran escala de proteínas terapéutica (s) de plasma o suero a partir de fuentes tales como sangre, plasma, suero u otras fuentes derivadas de sangre usando un adsorbente acoplado con un ligando para la captura de la (s) proteína (s), a partir de la solución de proteína.

Antecedentes técnicos y técnica anterior

15 La sangre humana y animal comprende muchas proteínas y enzimas, que poseen propiedades de terapéuticas y potencialmente para salvar vidas. Algunas de estas proteínas se pueden encontrar en las células rojas de la sangre, mientras que otras se encuentran en solución en el plasma o suero. Desde mediados del siglo 20 tales proteínas han sido el objetivo del aislamiento a gran escala y específico con el propósito de purificar y estandarizar las proteínas para el uso como agentes terapéuticos humanos. Ejemplos de proteínas de la sangre notables que están actualmente disponibles como productos terapéuticos aislados son: albúmina, inmunoglobulina G, Factor VIII e inhibidor de la alfa-1-proteínasa. Algunas de estas proteínas se producen en la escala de varios miles de kilogramos por año (albúmina e IgG), mientras que otras se producen sólo en gramo a kilogramo por escala al año. Sin embargo, a nivel mundial se procesan muchos millones de litros de sangre al año con el propósito de aislar estas proteínas.

25 La sangre, plasma sanguíneo y suero sanguíneo son proteínas extremadamente complicadas que contienen soluciones que comprenden muchos otros tipos de compuestos distintos de la proteína (s) o enzima (s) de interés, todo cuidadosamente equilibrado y regulado para trabajar en el torrente sanguíneo en un muy amplio intervalo de funciones bioquímicas complicadas tales como transporte de oxígeno, la defensa inmunológica y el sistema de coagulación que previene el sangrado excesivo a partir de las heridas. Especialmente cuando se extrae la sangre de un animal y expone a la atmósfera y la superficie de diferentes tipos de envases se vuelve muy inestable. Aunque los agentes químicos, tales como heparina y citrato de sodio, se pueden añadir para aumentar la estabilidad y para un cierto grado prevenir la coagulación del plasma sanguíneo obtenido por la separación de las células de la sangre, el plasma será todavía muy frágil, altamente concentrado y la solución de proteína viscosa comprendiendo además cantidades significativas de lípidos. A pesar de la adición de estabilizadores cualquier manipulación o alteración de la composición de plasma implica el riesgo de desestabilización accidental, que puede causar la activación de la cascada de la coagulación, precipitación de por ejemplo componentes lipídicos así como la desnaturalización de la proteína (s) objetivo y de ese modo hace la sangre muy difícil de trabajar. Así, cualquier método empleado para aislar las proteínas a partir de la sangre o soluciones derivadas de sangre debe tomar en consideración la inestabilidad inherente de la solución y las propias proteínas. Esto ha demostrado ser un reto muy importante para la producción a gran escala de productos terapéuticos a partir de sangre.

40 Además, desde un punto de vista tecnológico la complejidad e inestabilidad de la sangre hace la separación y aislamiento de las proteínas de la sangre mucho más complicado y económicamente exigente que el aislamiento de proteínas a partir de otros tipos de solución de proteína tales como sobrenadantes de cultivo de células de mamíferos y caldo de fermentación a partir de microorganismos modificados genéticamente como se usa típicamente en la industria de la biotecnología. Además, la industria de la biotecnología sólo aislará típicamente un producto específico a partir de un sobrenadante de cultivo celular, mientras que por razones económicas y éticas la industria terapéutica del fraccionamiento de la sangre generalmente debe aislar la mayor cantidad de productos como sea posible a partir de la cantidad limitada de sangre disponible.

50 El costo de la sangre, suero y plasma ha aumentado muy significativamente durante las últimas décadas siendo la principal razón debido al aumento del costo de las medidas de seguridad necesarias para prevenir propagar las enfermedades virales de los donantes de sangre a los destinatarios de los productos de la sangre. Por más de 10-20 años el costo muy alto del plasma sanguíneo, así como el aumento de los costos para implementar las etapas de eliminación viral y otras medidas de seguridad durante el proceso ha puesto a la industria de fraccionamiento de sangre bajo una presión significativa para aumentar el rendimiento por litro de los productos individuales tales como inmunoglobulina G (IgG) e inhibidor de la alfa-1-proteínasa.

Además, generalmente existe una fuerte necesidad de ampliar el número de productos que se pueden producir a partir de la misma cantidad de plasma es decir, producir un mayor número de diferentes proteínas a partir del plasma, sin dejar de ser

capaz de producir los productos existentes en rendimientos aceptables. La industria del fraccionamiento de la sangre ha experimentado que estas necesidades largamente sentidas son difíciles de satisfacer con la tecnología conocida y, aunque se han hecho intentos durante mucho tiempo para emplear técnicas de adsorción modernas como una alternativa a los métodos de precipitación establecidos existen todavía problemas importantes en términos de factibilidad económica y robustez del procesamiento de los métodos de adsorción hasta ahora descritos.

Uno de los métodos usados convencionalmente para el fraccionamiento de proteína (s) de plasma sanguíneo o del suero sanguíneo se ha descrito en US 2,390,074 (Cohn y otros) que describe un método para la fraccionamiento de proteínas de plasma o suero en gran escala que utilizan la precipitación con etanol y regula la temperatura, pH, fuerza iónica y tiempo para controlar la precipitación de ciertas proteínas de plasma humano. El método de fraccionamiento implica la adición gradualmente de etanol a la materia prima de plasma para obtener varios precipitados (fracciones) y los sobrenadantes correspondientes que comprenden diferentes soluciones de proteínas enriquecidas.

Un inconveniente del método de precipitación con etanol descrito por Cohn y otros es que algunas proteínas tienden a desnaturar durante el proceso lo que resulta en la disminución del rendimiento de la proteína que se aísla y la contaminación con agregados que necesitan que se eliminen antes de que se pueda obtener un producto terapéutico aceptable. Además, durante este método de fraccionamiento las proteínas precipitadas se tienen que resolubilizar para su procesamiento adicional. Tales soluciones de proteínas resolubilizadas pueden comprender niveles significativos de proteína insoluble (desnaturalizada) y material lipídico que lo hace difícil y que requiere mucho tiempo para elaborar el producto objetivo, lo que contribuye además significativamente a la pérdida de producto valioso. Además, es característico de este proceso que una proteína específica se pueda distribuir en varias de las fracciones obtenidas durante la adición gradualmente de etanol, que a su vez resulta en rendimientos bajos y elaboración que requiere mucho tiempo de las fracciones de proteínas re-combinadas.

En el fraccionamiento de por ejemplo el inhibidor de la alfa-1-proteinasa o inmunoglobulinas, tal como IgG, usando el método de fraccionamiento descrito por Cohn y otros el rendimiento del inhibidor de la alfa-1-proteinasa es tan bajo como 10-20 % y el rendimiento de IgG es tan bajo como 40-50 %. Sin embargo, ya que estos productos son muy necesarios y como existe un desabastecimiento del producto para satisfacer las necesidades de los pacientes, nuevos métodos para aislar tales productos son muy necesarios donde se reduce la pérdida de producto.

Durante la última década se han hecho muchos intentos para desarrollar un proceso de fraccionamiento que pueda proporcionar un aumento del rendimiento usando una variedad de otras técnicas, incluyendo la cromatografía. Sin embargo, los inconvenientes asociados con las técnicas de adsorción conocidas tales como regímenes de flujo bajo y capacidades de unión bajo lo que resultan en una baja productividad así como falta de robustez y dificultades en la aplicación de procedimientos de limpieza seguros han hecho difícil equilibrar el rendimiento y economía implicada en el fraccionamiento de proteínas de suero y plasma sanguíneo. El núcleo de los procesos de fabricación industriales existentes por lo tanto, todavía se basa en el trabajo de Cohn y otros.

Los procesos de aislamiento y purificación usados en la actualidad han demostrado ser insuficientes y las impurezas trazas resultantes de los procesos de purificación ineficientes pueden ser capaces de estimular una respuesta inmune en los pacientes. Además, los procesos de purificación que no logran separar la parte activa e inactiva del producto, como los procesos usados actualmente, pueden dar lugar a un producto con eficacia impredecible y una actividad específica, que varía entre lotes separados.

Incluso los intentos de desarrollar técnicas de adsorción avanzadas tales como la adsorción de lecho expandido, que se introdujo por primera vez a principios de 1990, no han logrado mejorar el empleo de las técnicas de adsorción. Finette G.M.S. y otros, *Biotechnol. Prog.*, 1998, 14, pp286-293, así describe la aplicación de un adsorbente que tiene un diámetro de partícula medio de 180 micras y una densidad de 1.79 g/ml de lecho compactado y la adsorción de lecho expandido del inhibidor de -1- proteinasa a partir de la fracción II+III de Cohn. Los autores concluyen que un régimen de flujo volumétrico de 0.2 ml/min (correspondiente a un régimen de flujo lineal de 0.1 cm/min o 60 cm/hora) resultará en un rendimiento del inhibidor de la alfa-1-proteinasa de 50 %. Los autores afirman además que los regímenes de flujo más altos disminuirán el rendimiento así como perturbarán el flujo de pistón en la columna. Tales regímenes de flujo bajos no son económicamente atractivos y por lo tanto prohíben el uso de ejemplo adsorción de lecho expandido para el fraccionamiento industrial de proteínas de la sangre.

Otros intentos para aplicar la adsorción de lecho expandido para el aislamiento de proteínas de plasma humano confirman los regímenes de flujo bajos aplicados con técnicas anteriores. US 6,617,133 describe así el uso de un adsorbente Streamline SP (Amersham Biosciences), que de acuerdo con el proveedor, tiene un diámetro de partícula medio en

volumen de 200 micras y una densidad de 1.20 g/ml para el aislamiento de la albúmina sérica humana usando un régimen de flujo de la aplicación de la materia prima de 100 cm/hora. Un régimen de flujo bajo de este tipo es limitante de la productividad del sistema de adsorción y así requiere columnas muy grandes y resulta en materiales de alto costo por unidad de albúmina humana producida.

5

WO02/096215 describe un método de fraccionamiento de una mezcla que contiene proteína en donde la mezcla que contiene proteína se selecciona del grupo que consiste de leche, productos derivados de la leche, materias primas derivadas de la leche, productos derivados de vegetales, extractos derivados de vegetales, productos derivados de frutas, extractos derivados de frutas, productos derivados de pescado, y extractos derivados de pescado, dicho método que comprende las etapas de:

10

- (a) opcionalmente ajustar el pH de la mezcla;
- (b) aplicar dicha mezcla a una columna de adsorción que comprende un adsorbente, dicho adsorbente comprende una partícula con al menos un núcleo no poroso de alta densidad rodeado por un material poroso, el adsorbente tiene una densidad de partículas de al menos 1.5 g/ml y un tamaño de partícula medio en volumen de a lo máximo 150 µm;
- (c) opcionalmente lavar la columna;
- (d) eluir al menos una proteína del adsorbente.

15

Burnouf (J Chromatogr. B 664 (1995) 3-15) es un artículo de revisión que trata sobre las formas en que se ha usado el fraccionamiento cromatográfico en el fraccionamiento del plasma. En consecuencia, se desea por lo tanto un proceso para el fraccionamiento de proteínas de suero o plasma que es rápido, robusto (es decir, siendo fiable durante la operación diaria con tiempo de detención bajo), específico y seguro, y que al mismo tiempo proporciona un rendimiento y pureza mejorada de los productos de interés durante el procesamiento y de ese modo facilita un equilibrio aceptable y mejorado entre el rendimiento y la economía, en comparación con los procesos usados convencionalmente, por ejemplo el proceso descrito por Cohn y otros, y que resuelve los problemas anteriormente mencionados. Un proceso de este tipo se proporciona en la presente descripción.

20

25

Resumen de la invención

En consecuencia, la presente invención se refiere a un proceso para el aislamiento y/o fraccionamiento de soluciones de proteínas. El proceso de la presente invención es rápido, robusto, específico y seguro, y proporciona un rendimiento y pureza mejorada del producto de interés durante el procesamiento y de ese modo facilita un equilibrio mejorado y aceptable entre el rendimiento de producto y la economía implicada, en comparación con los métodos usados convencionalmente. El proceso de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para la producción a gran escala.

30

35

Así, la presente invención proporciona un proceso para el aislamiento a gran escala de proteínas a partir de una solución de proteína donde la solución de proteína se obtiene a partir de sangre humana, tal como suero humano y/o plasma humano, en el proceso en que se separan la albúmina y la IgG uno del otro, dicho procedimiento que comprende las etapas de:

40

- a) opcionalmente ajustar el pH de la solución de proteína a un pH preestablecido;
- b) opcionalmente ajustar la fuerza iónica o conductividad de la solución de proteína a una fuerza iónica preestablecida o una conductividad preestablecida;

45

- c) aplicar dicha solución de proteína a una columna de adsorción que comprende un adsorbente, dicho adsorbente comprende una partícula con al menos un núcleo no poroso de alta densidad, rodeado por un material poroso, el adsorbente comprende una densidad de partículas de al menos 1.5 g/ml y un diámetro de partícula medio en volumen de a lo máximo 150 µm;

50

- d) lavar una o más de las proteínas a aislar a través del adsorbente, sin una o más proteínas que se unen específicamente al adsorbente, para obtener una fracción de material no enlazado;

55

- e) someter el adsorbente a un tampón de elución para eluir al menos una de las proteínas enlazadas específicamente al adsorbente;

en donde tanto:

la albúmina e IgG se obtienen a partir del adsorbente por elución gradualmente; o

la albúmina se obtiene como material no enlazado a partir del adsorbente y posteriormente la IgG se obtiene del adsorbente por elución gradualmente.

Preferentemente, el proceso es un proceso de adsorción de lecho expandido.

Preferentemente, después de la etapa (e), el adsorbente se somete a al menos un tampón de elución para eluir al menos una proteína adicional enlazada específicamente al adsorbente.

Preferentemente, la solución de proteína no se complementa con un alcohol.

Preferentemente, la solución de proteína se somete a al menos un tratamiento de eliminación del virus. Adecuadamente, el tratamiento de eliminación de virus se realiza antes de contactar la solución de proteína con el adsorbente. Adecuadamente, el tratamiento de eliminación de virus implica la adición de detergente y/o un disolvente orgánico, tal como Tween, Tritón, tri-n-butilfosfato, a la solución de proteína.

[0022] Preferentemente, el adsorbente comprende un polímero matriz funcionalizado que lleva una pluralidad de grupos funcionales unidos covalentemente que comprenden un sistema de anillo aromático o heteroaromático y/o uno o más grupos ácidos. Preferentemente el grupo funcional se selecciona del grupo que consiste de ácido 2-mercaptobenzoico, ácido 2-mercaptonicotínico, ácido 2-aminobenzoico, ácido 3-aminobenzoico, y ácido 4-aminobenzoico, ácido 4-hidroxifenilomercapto-acético, ácido 4-hidroxifenilomercapto-propiónico, ácido 4-hidroxifenilomercapto-butanoico, ácido 2,3-dihidroxi-benzoico, ácido 2,4 dihidroxi-benzoico, ácido 2,5 dihidroxi-benzoico, ácido 2,6 dihidroxi-benzoico, ácido 3,4-dihidroxi-benzoico, ácido 3,5-dihidroxi-benzoico, ácido mercaptobencimidazol sulfónico, ácido ortanílico, ácido metanílico, ácido sulfanílico, ácido 4-metilanilina-2-sulfónico, ácido 4-metoxianilina-2-sulfónico, ácido anilina-2,5-disulfónico, ácido N-metilmetanílico, ácido 7-amino-1-naftol-3-sulfónico, ácido 1-naftol-4-sulfónico, ácido 2-naftol-6-sulfónico y ácido 2-hidroxi-3-naftoico, y ácido 2-mercaptobenzimidazol-sulfónico, ácido 3,4-diaminobenzoico, y ácido 2-(4-aminofeniltio)acético.

Preferentemente, las proteína en sangre humana se seleccionan del grupo que consiste de IgA, IgM, IgD, IgE, inhibidor de la alfa-1-proteinasa, proteína de procoagulación de la sangre, proteína anticoagulante de la sangre, agente trombolítico, proteína anti-angiogénica, α -2-antiplasmina, inhibidor de la esterasa C-1, apolipoproteína, HDL, LDL, fibronectina, beta-2-glicoproteína I, fibrinógeno, plasminógeno, plasmina, activador del plasminógeno, inhibidor del plasminógeno, inhibidor de la proteasa plasmática, anti-trombina III, estreptoquinasa, inhibidor de inter-alfa-tripsina, α -2-macroglobulina, proteína amiloide, ferritina, pre-albúmina, GC-globulina, hemopexina, C3-complemento, transferrina, uroquinasa, α -1-ácido-glicoproteína, y los factores de coagulación o anti-coagulación tal como Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, factor von Willebrand, complejo Factor VIII - factor von Willebrand, Factor IX, Factor X, Factor XI, inhibidor C 1, proteína C y/o proteína S.

Preferentemente, al menos dos fracciones de proteína se proporcionan por el proceso. Preferentemente, cada una de las fracciones de proteína obtenidas en el proceso tiene una cantidad de contaminación cruzada de proteínas de menos que 20%.

Preferentemente al menos 2, tal como 3, por ejemplo 4, tal como 5, por ejemplo 6 de las proteínas seleccionadas del grupo que consiste de IgA, IgM, IgD, IgE, inhibidor de la alfa-1-proteinasa, proteína de procoagulación de la sangre, proteína anticoagulante de la sangre, agente trombolítico, proteína anti-angiogénica, α -2-antiplasmina, inhibidor de la esterasa C-1, apolipoproteína, HDL, LDL, Fibronectina, beta-2-glicoproteína I, fibrinógeno, plasminógeno, plasmina, activador del plasminógeno, inhibidor del plasminógeno, inhibidor de la proteasa plasmática, anti-trombina III, estreptoquinasa, inhibidor de inter-alfa-tripsina, α -2-macroglobulina, proteína amiloide, ferritina, pre-albúmina, GC-globulina, hemopexina, complemento-C3, transferrina, uroquinasa, α -1-ácido-glicoproteína, y los factores de coagulación o anti-coagulación tales como Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, factor de von Willebrand, complejo Factor VIII - factor von Willebrand, Factor IX, Factor X, Factor XI, inhibidor de C1, proteína C y/o proteína S se separan simultáneamente entre sí en al menos 2, tal como 3, por ejemplo 4, tal como 5, por ejemplo 6 fracciones individuales de proteína.

Descripción detallada de la invención

Durante la última década el desarrollo dentro de la adsorción de lecho expandido ha ganado cada vez más la atención debido a la gran aplicabilidad para la purificación a gran escala. Las proteínas se pueden purificar a partir de una solución cruda de proteína sin la necesidad de clarificación por separado, concentración y otros tipos de purificación inicial para eliminar la materia en partículas. Los adsorbentes, usados para la adsorción de lecho expandido, capturan las moléculas objetivo usando los mismos principios como la cromatografía de afinidad, intercambio iónico o interacción hidrófoba.

5 El concepto básico y la técnica anterior en el campo de la adsorción de lecho expandido se han descrito en, por ejemplo. EP 0 722 771, WO 01/85329, WO 92/18237, WO 2000/25884, WO 02/05923, WO 99/65586 y WO 00/57982 que da a conocer los diferentes tipos de aparatos y equipos de adsorción de lecho expandido, así como diferentes tipos de partículas de adsorción las que los presentes inventores encontraron que se adaptan adecuadamente o se desarrollan adicionalmente para el aislamiento de proteínas de suero o plasma como se describe en la presente invención.

10 El proceso de acuerdo con la presente invención se puede realizar a una gran escala. En el presente contexto, el término "gran escala" se refiere al procesamiento de un volumen de materia prima de al menos 1 litro por ciclo de adsorción, tal como al menos 5 litros por ciclo de adsorción, tal como al menos 10 litros por ciclo de adsorción, tal como al menos 25 litros por ciclo de adsorción, tal como al menos 100 litros por ciclo de adsorción, tal como al menos 1000 litros por ciclo de adsorción y así distinguir la invención de cualquier experimentos a escala analítica y pequeña que no se refieren a los requisitos severos de robustez y reproducibilidad como en un medio ambiente de producción a gran escala industrial.

15 La solución de proteína

De acuerdo con la presente invención, las proteínas de interés se separan y aíslan a partir de una solución de proteína. La solución de proteína se obtiene a partir de sangre humana, tal como suero humano, y/o plasma humano,

20 En una modalidad de la presente invención la solución de proteína usada puede complementarse con un alcohol.

25 En el presente contexto, el término "complementado con un alcohol" se refiere a la adición de un alcohol a la solución de proteína para lograr la separación de al menos dos componentes presentes en la solución de proteína por lo cual un componente se volverá presente en un sobrenadante y el otro componente se volverá presente en una fracción. Particularmente tal separación de la solución de proteína implica gradualmente aumentar la cantidad de alcohol añadido a la solución de proteína y de ese modo separar al menos una proteína de suero o plasma de la solución de proteína. En el curso del proceso de separación la (s) proteína (s) de interés puede (n) estar presente(s) ya sea en el sobrenadante o en la fracción. En una modalidad de la presente invención la solución de proteína se complementa con un alcohol para comprender al menos 0.1 vol.% de un alcohol, por ejemplo al menos 0.5 vol. %, tal como al menos 0.75 vol. %, por ejemplo al menos 1.0 vol. %, tal como al menos 1.5 vol. %, por ejemplo al menos 2.0 vol. %, tal como al menos 3.0 vol. %, por ejemplo al menos 5.0 vol. %, tal como al menos 7.5 vol. %, por ejemplo al menos 10.0 vol. %, tal como al menos 20 vol. %, por ejemplo al menos 25.0 vol. %, tal como al menos 40 vol. %, por ejemplo al menos 50.0 vol. %, tal como al menos 60 vol. %, por ejemplo al menos 75.0 vol. %.

35 En aún una modalidad de la presente invención la solución de proteína tiene un contenido de alcohol de al menos 0.1 vol.% de un alcohol, por ejemplo al menos 0.5 vol. %, tal como al menos 0.75 vol. %, por ejemplo al menos 1.0 vol. %, tal como al menos 1.5 vol. %, por ejemplo al menos 2.0 vol. %, tal como al menos 3.0 vol. %, por ejemplo al menos 5.0 vol. %, tal como al menos 7.5 vol. %, por ejemplo al menos 10.0 vol. %, tal como al menos 20 vol. %, por ejemplo al menos 25.0 vol. %, tal como al menos 40 vol. %, por ejemplo al menos 50.0 vol. %, tal como al menos 60 vol. %, por ejemplo al menos 75.0 vol. %, tal como al menos 77 vol. %.

45 En el presente contexto el término "sobrenadante" se refiere a una fase líquida, la cual yace por encima de una fracción líquida, un fragmento del sedimento o un fragmento precipitado obtenido por la adición de un alcohol a la solución de proteína, de acuerdo con la presente invención.

50 En el presente contexto el término "fracción" se refiere a una porción de la solución de proteína, la cual se puede separar del sobrenadante por un proceso de fraccionamiento, tal como filtración, microfiltración, centrifugación, destilación o cromatografía y la fracción puede ser ya sea una combinación de compuestos o un compuesto puro. En una modalidad de la presente invención la fracción puede estar en la forma de un líquido (una fracción líquida), un sedimento (una fracción sedimento) o un precipitado (una fracción precipitada).

55 En una modalidad de la presente invención la solución de proteína puede complementarse con un alcohol seleccionado del grupo que consiste de metanol, etanol, n-propanol, i-propanol, n-butanol, i-butanol, s-butanol, t-butanol, metilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, dietilenglicol, metileno-etilenglicol, y dimetilenglicol.

En una modalidad preferida de la presente invención la solución de proteína comprende plasma o suero humano. En aún una modalidad de la presente invención, la solución de proteína comprende fracción(es) de suero o plasma humano y/o sobrenadante(s) de plasma o suero.

Además, en una modalidad de la presente invención las fracciones obtenidas a partir de un precipitado resubilizado, se pueden obtener por adición gradual de alcohol a la solución de proteína. Particularmente, una fracción de plasma o suero se pueden proporcionar a partir de un precipitado resolubilizado obtenido por la adición de alcohol al plasma o suero.

De acuerdo con la presente invención una solución de proteína se puede obtener a partir de la solución de proteína y puede comprender la combinación de uno o más sobrenadante (s) y/o uno o más fracciones resolubilizadas. Particularmente una solución de proteína de plasma o suero humano se puede obtener por recombinación de uno o más sobrenadantes y/o uno o más precipitados resolubilizados obtenidos por la adición de alcohol a plasma o suero humano.

En una modalidad de la presente invención la temperatura de la solución de proteína puede estar en el intervalo de -5 a 50 °C, con mayor preferencia en el intervalo de -5 a 40 °C, aún con mayor preferencia en el intervalo de -5 a 30 °C, aún con mayor preferencia en el intervalo de -5 a 20 °C, aún con mayor preferencia en el intervalo de 0 a 10 °C o en el intervalo de 0 a 50 °C, con mayor preferencia en el intervalo de 10 a 50 °C, aún con mayor preferencia en el intervalo de 20 a 50 °C, aún con mayor preferencia en el intervalo de 30 a 50 °C, aún con mayor preferencia en el intervalo de 40 a 50 °C.

El método de fraccionamiento/separación

Como se mencionó anteriormente la forma convencional de fraccionamiento de soluciones de proteínas implica el método descrito por Cohn y otros que implica adición gradual de alcohol a la solución de proteína por lo que la proteína (s) de interés se separa (n) gradualmente de la solución de proteína. Este proceso ha sido descrito en más detalle en: Cohn y otros, "Separation into Fractions of Protein and Lipoprotein Components" J. Am. Chem. Soc, 68, 459-475, 1946; E, 3. Cohn y otros, Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins, IV, A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids, The Journal of the American Chemical Society, vol. LXVIII (Ene.-Jul. 1946), págs. 459-475; US 2,390,074 y US 2,469,193 los que se incorporan como referencia.

En el presente contexto, los términos " fraccionamiento" y " separación" se usan indistintamente y se refieren al proceso de preparación de la solución de proteína antes de contactar con el adsorbente para el aislamiento de la proteína (s) de interés.

En una modalidad de la presente invención un fraccionamiento gradualmente de soluciones de proteínas por la adición de alcohol para obtener proteína (s) se puede ilustrar por uno o más de las siguientes operaciones:

(i) La solución de proteína, tal como el plasma se puede inicialmente congelar y después someter a un procedimiento lento y controlado de congelación, por lo cual se forma un crioprecipitado que comprende Factor VIII (en conjunto con el factor de von Willebrand, vWF) y fibrinógeno y un sobrenadante (denominado plasma pobre en frío).

(ii) La fracción crioprecipitada obtenida en (i) se puede resolubilizar para formar una solución de proteína y la(s) proteína(s) se puede(n) aislar contactándola (s) con un adsorbente. Particularmente la(s) proteína(s) tal como Factor VIII, vWF y fibrinógeno se pueden aislar a partir de la solución de proteína obtenida de la fracción resolubilizada.

(iii) El sobrenadante de (i), plasma pobre en frío, se puede complementar con alcohol y se forman la fracción I (un precipitado) y sobrenadante.

(iv) El sobrenadante I se pueden complementar con más alcohol y se forman la fracción II+III precipitada y sobrenadante II+III. La fracción II+III se pueden separar y resolubilizar para formar una solución de proteína y la(s) proteína(s) de interés se puede(n) aislar contactando estas con un adsorbente. Particularmente la proteína (s) tal (es) como inmunoglobulinas (tal como IgG) se puede (n) aislar de la solución de proteína obtenida a partir de las fracciones II+III. El sobrenadante II+III se comprenden principalmente de albúmina e inhibidor de la alfa-1-proteinasa.

(v) El sobrenadante II+III se puede complementar además con alcohol y formar el sobrenadante IV-1 y fracción IV-1 precipitada. La Fracción IV-1 se puede separar y resolubilizar y formar una solución de proteína y la(s) proteína (s) se puede(n) aislar contactando estas con un adsorbente. Particularmente, la proteína (s) de plasma tales como inhibidor de la alfa-1-proteinasa, anti-trombina III y complejo del Factor IX se pueden aislar de la solución de proteína obtenida a partir de la fracción IV-1.

(vi) El sobrenadante IV-1 se puede complementar con más alcohol para formar la fracción IV-4 precipitada y sobrenadante IV-4. La fracción IV-4 se puede separar y resolubilizar para formar una solución de proteína y la proteína

(s) de interés se puede(n) aislar contactando estas con un adsorbente. Particularmente Butirilcolinesterasa se pueden aislar a partir de la solución de proteína obtenida de la fracción IV-4.

(vii) El sobrenadante VI -4 se puede complementar además con alcohol para proporcionar la fracción V precipitada que se pueden separar y resolubilizar para formar una solución de proteína y la(s) proteína (s) de interés se puede(n) aislar contactando estas con un adsorbente. Particularmente la albúmina se puede aislar de la solución de proteína obtenida a partir de la fracción V.

En una modalidad de la presente invención la solución de proteína, puede seleccionarse del grupo que consiste de plasma pobre en crío, sobrenadante I, sobrenadante II+III, sobrenadante IV-1, sobrenadante IV-4, crioprecipitado resolubilizado, fracción I resolubilizada, fracción II + III resolubilizada, fracción IV-1 resolubilizada, fracción IV-4 resolubilizada, fracción V resolubilizada y cualquier combinación de estos.

En una modalidad particular de la presente invención la solución de proteína puede seleccionarse del grupo que consiste de sobrenadante I, sobrenadante II+III, fracción IV-1 resolubilizada, y cualquier combinación de estos.

En aún una modalidad particular de la presente invención la solución de proteína puede seleccionarse del grupo que consiste de sobrenadante I, sobrenadante II+III, sobrenadante I+II+III, y fracción IV-1 resolubilizada y cualquier combinación de estos.

En una modalidad particular adicional de la presente invención la solución de proteína se puede seleccionar de el grupo de sobrenadante I y fracción II + III resolubilizada.

Las fracciones precipitadas se pueden resolubilizar en una amplia variedad de soluciones acuosas que incluyen agua pura. En muchas modalidades preferidas, el medio de resolubilización será un tampón acuoso que tiene un pH y fuerza iónica adecuada para la siguiente etapa de procesamiento corriente abajo por ejemplo una etapa de adsorción de acuerdo con la invención.

En una modalidad de la presente invención las fracciones precipitadas se pueden obtener a partir de un sobrenadante por filtración, centrifugación, decantación, ultrafiltración y/o sedimentación.

En una modalidad de la presente invención la solución de proteína puede obtenerse por el método de fraccionamiento de Cohn como se describe por Cohn y otros, "Separation into Fractions of Protein and Lipoprotein Components" J. Am. Chem. Soc, 68, 459-475, 1946; E. J. Cohn y otros, Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins, IV, A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids, The Journal of the American Chemical Society, vol. LXVIII (Ene.-Jul. 1946), págs. 459-475; US 2,390,074 y US 2,469,193.

En una modalidad de la presente invención la solución de proteína comprende al menos una proteína de plasma o suero obtenida del fraccionamiento de plasma o suero por adición de etanol, por ejemplo el proceso de fraccionamiento de Cohn original o variantes del mismo como el proceso de Cohn-Oncley.

La proteína

En la presente invención la proteína (s) que se aísla es una proteína de sangre humana, tal como una proteína de plasma o una proteína de suero. En el presente contexto el término "proteína (s) de plasma o suero" se refiere a la proteína (s) que es/son producidos o requerido(s) por el cuerpo humano. Normalmente estas proteínas de plasma o suero se incluyen en la sangre de humanos y particularmente algunas de estas proteínas se encuentran originalmente en las células rojas de la sangre, mientras que otras se encuentran en solución en el plasma o suero.

El plasma es un componente de la sangre. Es el líquido en el que se suspenden las células de la sangre. El plasma sanguíneo contiene proteínas, lípidos, nutrientes, productos finales metabólicos, hormonas y electrolitos inorgánicos. El plasma sanguíneo se estabiliza típicamente por la adición de anticoagulantes tales como citrato de sodio, heparina y EDTA.

El suero es el mismo que el plasma sanguíneo, excepto que los factores de coagulación (tal como fibrinógeno y Factor VIII) se han eliminado.

En una modalidad de la presente invención, adicionalmente a la albúmina o IgG una o más proteínas de plasma o suero a ser aislada se seleccionan del grupo que consiste de IgA, IgM, IgD, IgE, inhibidor de la alfa-1-proteinasa (igual que α -1-

antitripsina), proteína de procoagulación de la sangre, proteína anticoagulante de la sangre, agente trombolítico, proteína anti-angiogénica, α -2-antiplasmina, inhibidor de la esterasa C-1, apolipoproteína, HDL, LDL, Fibronectina, beta-2-glicoproteína I, fibrinógeno, plasminógeno, plasmina, activador del plasminógeno, inhibidor del plasminógeno, inhibidor de la proteasa plasmática, anti-trombina III, estreptoquinasa, inhibidor de inter-alfa-tripsina, α -2-macroglobulina, proteína amiloide, ferritina, pre-albúmina, GC-globulina, hemopexina, complemento-C3, transferrina, uroquinasa, α -1-ácido-glicoproteína, y los factores de coagulación o anti-coagulación tales como Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, factor von Willebrand, complejo Factor VIII - factor von Willebrand, Factor IX, Factor X, Factor XI, inhibidor CI, proteína C y/o proteína S.

La columna

El adsorbente capaz de capturar la proteína (s) una o más se lleva a cabo dentro de una columna. En el presente contexto, el término "columna" se refiere a cualquier tipo de envase que se puede suministrar con al menos una entrada y al menos una salida para la aplicación de la solución de proteína a la columna y eluir con posterioridad la proteína. La entrada y la salida puede para ciertas columnas ser la misma (por ejemplo, para tanques de adsorción por lotes). La columna puede estar en la forma de una columna de adsorción de lecho expandido (EBA), columna de lecho compactado, una columna de adsorción de lecho fluidizado, una columna de adsorción de lecho suspendido, reactor de membrana, o un tanque de adsorción por lote. La columna adsorbente se puede usar ya sea en un sistema discontinuo o en un sistema continuo. Típicamente la columna de lecho compactado y columnas de adsorción de lecho expandido operan bajo condiciones de flujo de pistón (es decir, sin retromezcla de líquido y turbulencia en el lecho adsorbente) mientras que las columnas de lecho suspendido, y tanques de adsorción por lotes operan con un alto grado de mezcla al menos en la mayor parte del volumen de columna.

El hecho de que la tecnología de EBA generalmente, pueda trabajar de manera eficiente con solución de proteína no clarificada hace esto atractivo para el aislamiento de proteínas. En comparación con los procesos basados en técnicas de adsorción de lecho compactado EBA puede ofrecer un proceso sólido que comprende menos etapas y así resultar en rendimientos aumentados y una economía de proceso mejorada. Debido a la expansión del lecho adsorbente durante la ejecución de un proceso EBA, las columnas EBA aún se pueden escalar a escala industrial sin ninguna consideraciones importantes con respecto a presiones posteriores aumentadas o fallo del proceso debido a la obstrucción del sistema que frecuentemente es un problema cuando se usan columnas de lecho compactados.

De acuerdo con la presente invención la solución de proteína se aplica a una columna de lecho compactado o una columna de lecho expandido que comprende un adsorbente.

En el presente contexto, el término "lecho compactado" se refiere a modalidades en donde las partículas adsorbentes se emplean en columnas que operan con las partículas en un estado sedimentado o compactado en donde todas las partículas se fijan en la parte superior mutuamente. Frecuentemente las columna de lecho compactado se equipan con adaptadores superiores e inferiores que definen y fijan todo el lecho adsorbente completo para evitar cualquier movimiento de la partícula durante la operación.

En el presente contexto, el término "lecho expandido" se refiere a modalidades en donde las partículas adsorbentes se emplean en columnas que permiten al adsorbente expandir con un flujo de líquido hacia arriba a través de la columna. La columna se diseñará para evitar el exceso de mezcla de líquido y turbulencia en la columna mientras que las partículas adsorbentes individuales se mantienen en un estado dinámico no fijo moviéndose sólo en una zona local estrecha en la columna. Mientras los lechos expandidos preferidos tienen una pequeña zona de mezcla en la parte inferior de la columna donde el líquido entrante se distribuye por toda la sección transversal de la columna, los lechos expandidos generalmente operan bajo condiciones de flujo de pistón en similitud con lechos compactados. En una modalidad de la presente invención el adsorbente se mantiene en una columna de adsorción de lecho expandido y preferentemente se usa para el aislamiento a gran escala de una o más proteínas a partir de una solución de proteína.

El adsorbente

Es un objeto adicional de esta invención proporcionar un proceso para el aislamiento de proteína (s) a partir de una solución de proteína basado en la adsorción a cualquier tipo de material en fase sólida de cualquier forma y formato, que incluye la adsorción de lecho compactado, adsorción por lote, adsorción de lecho suspendido, adsorción de lecho expandido (EBA), adsorción de lecho fluidizado y adsorción basada en membrana. Además, la adsorción se puede caracterizar por el uso de las características selectivas del adsorbente y/o química del ligando que permiten la unión específica y posterior elución de sustancialmente solo una única sustancia biomolecular, o alternativamente, que permiten un grupo de unión específica de

algunas sustancias biomoleculares seguido por elución selectiva y consecutiva de una o más sustancias a partir del adsorbente.

5 El adsorbente comprende un ligando adecuado para unir a una o más proteína (s) de interés. En una modalidad de la presente invención el adsorbente se puede opcionalmente lavar y/o equilibrar con uno o más tampón de lavado y/o equilibrio. Para un amplia variedad de modalidades preferidas de la presente invención es de importancia crítica que el adsorbente es una partícula que tiene características combinadas en términos de tamaño y densidad. Se ha encontrado así que para soluciones de proteínas muy concentradas tales como plasma o suero es muy deseable emplear partículas que tienen un diámetro de partículas medio en volumen de menos de 150 μm para obtener una rápida y eficiente unión a la proteína (que es importante para la productividad y así la economía de una planta la producción). Sin embargo se ha encontrado además que es la combinación del diámetro pequeño de las partículas adsorbente (más abajo de 150 μm) con una cierta densidad mínima (más de 1.5 g/ml) de partículas adsorbentes lo que permite mejoras significativas en la productividad de la planta de producción. De este modo se puede lograr una combinación única de unión rápida y eficiente de la proteína con altos regímenes de flujo de líquido a través de las columnas empleadas para el proceso de adsorción. 10 Particularmente para columnas no compactadas tales como por ejemplo columnas de lecho expandido y columnas de lecho suspendido los altos regímenes de flujo de líquido obtenibles con los adsorbentes de acuerdo con la invención pueden ser significativas. Para columnas de lecho compactados puede ser una clara ventaja que las pequeñas partículas adsorbentes tienen una alta densidad que proporciona la sedimentación rápida durante el procedimiento de empaque y de re-empaque, que de otra forma es una etapa de proceso lento y exigente. Generalmente se encontró que un diámetro medio en volumen más pequeño de las partículas puede desear una mayor densidad de las partículas. 15

Ejemplos de partículas adsorbentes comerciales que se pueden emplear para algunas de las modalidades de la presente invención son:

- 25 - FastLine UFC NNSDW, UpFront Chromatography A/S, Dinamarca que tiene un diámetro de partículas medio en volumen de 70 μm y una densidad de 2.9 g/ml.
- STREA MLINE Direct CST-1, Amersham Biosciences, Suecia que tiene un diámetro de partículas medio en volumen de 135 μm y una densidad de 1.8 g/ml.
- 30 - Adsorbentes de intercambio iónico Q y CM HyperZ, Biosepra SA, Francia, que tienen un diámetro de partículas medio en volumen de 75 μm y una densidad de 3.2 g/ml.

Específicamente en la adsorción de lecho expandido el régimen de flujo, el tamaño de las partículas y la densidad de las partículas pueden todos tener influencia sobre la expansión de lecho expandido y es importante controlar el grado de expansión de tal manera para mantener las partículas dentro de la columna cuando se trabaja con adsorción de lecho expandido. Para la aplicabilidad industrial puede ser de interés tener un alto régimen de flujo y una baja expansión. El grado de expansión se puede determinar como donde OH es la altura del lecho en el modo de lecho compactado sin flujo a través de la columna) y H es la altura del lecho en el modo expandido (con un flujo dado a través de la columna). En una modalidad de la presente invención el grado de expansión está en el intervalo de 1.1-6, tal como 1.1-5, por ejemplo 1.1-4, tal como 1.2-5, por ejemplo 1.5-4 tal como 2-4, tal como, tal como 2-3, tal como 3-4. En otra modalidad de la presente invención el grado de expansión es a lo máximo 1.2, por ejemplo a lo máximo 1.3, tal como a lo máximo 1.5, por ejemplo a lo máximo 1.8 tal como a lo máximo 2, tal como a lo máximo 2.5, por ejemplo a lo máximo 3, tal como a lo máximo 3.5, por ejemplo a 4, tal como a lo máximo 4.5. En aún una modalidad de la presente invención el régimen de flujo es 5 cm/min y el grado de expansión es a lo máximo 1.2, por ejemplo a lo máximo 1.3, tal como a lo máximo 1.5, por ejemplo a lo máximo 1.8 tal como a lo máximo 2, tal como a lo máximo 2.5, por ejemplo a lo máximo 3, tal como a lo máximo 3.5, por ejemplo a 4, tal como a lo máximo 4.5. En una modalidad adicional de la presente invención el régimen de flujo es 7 cm/min y el grado de expansión es a lo máximo 1.2, por ejemplo a lo máximo 1.3, tal como a lo máximo 1.5, por ejemplo a lo máximo 1.8 tal como a lo máximo 2, tal como a lo máximo 2.5, por ejemplo a lo máximo 3, tal como a lo máximo 3.5, por ejemplo a 4, tal como a lo máximo 4.5. En aún una modalidad de la presente invención el régimen de flujo es 10 cm/min y el grado de expansión es a lo máximo 1.2, por ejemplo a lo máximo 1.3, tal como a lo máximo 1.5, por ejemplo a lo máximo 1.8 tal como a lo máximo 2, tal como a lo máximo 2.5, por ejemplo a lo máximo 3, tal como a lo máximo 3.5, por ejemplo a 4, tal como a lo máximo 4.5. En aún una modalidad de la presente invención el régimen de flujo es 15 cm/min y el grado de expansión H/HO es a lo máximo 1.2, por ejemplo a lo máximo 1.3, tal como a lo máximo 1.5, por ejemplo a lo máximo 1.8 tal como a lo máximo 2, tal como a lo máximo 2.5, por ejemplo a lo máximo 3, tal como a lo máximo 3.5, por ejemplo a 4, tal como a lo máximo 4.5. Todavía en una modalidad de la presente invención el régimen de flujo es 20 cm/min y el grado de expansión H/HO es a lo máximo 1.2, por ejemplo a lo máximo 1.3, tal como a lo máximo 1.5, por ejemplo a lo máximo 1.8 tal como a lo máximo 2, tal como a lo máximo 2.5, por ejemplo a lo máximo 3, tal como a lo máximo 3.5, por ejemplo a 4, tal como a lo máximo 4.5. 50 55

En una modalidad de la presente invención el régimen de flujo lineal de la columna de lecho compactado o la columna de lecho expandido puede ser al menos 2 cm/min, con mayor preferencia al menos 3 cm/min, aún con mayor preferencia al menos 4 cm/min, aún con mayor preferencia al menos 5 cm/min, aún con mayor preferencia al menos 6 cm/min, aún con mayor preferencia al menos 7 cm/min, aún con mayor preferencia al menos 8 cm/min, aún con mayor preferencia al menos 10 cm/min, aún con mayor preferencia al menos 12 cm/min, aún con mayor preferencia al menos 15 cm/min, aún con mayor preferencia al menos 20 cm/min, aún con mayor preferencia al menos 25 cm/min, aún con mayor preferencia al menos 30 cm/min, aún con mayor preferencia al menos 40 cm/min, aún con mayor preferencia al menos 50 cm/min. En aún una modalidad de la presente invención el régimen de flujo lineal está en el intervalo de 1-75 cm/min, tal como 2-75 cm/min, por ejemplo 5-75 cm/min, tal como 7-75 cm/min, por ejemplo 10-75 cm/min, tal como 15-75 cm/min, por ejemplo 20-75 cm/min, tal como 30-75 cm/min, por ejemplo 40-75 cm/min, tal como 50-75 cm/min, por ejemplo 1-50 cm/min, tal como 2-50 cm/min, por ejemplo 2-30' cm/min, tal como 3-30 cm/min, tal como 3-20 cm/min, tal como 3-15 cm/min, tal como 4-30 cm/min, tal como 4-25 cm/min, tal como 4-20 cm/min, tal como 4-15 cm/min, tal como 5-25 cm/min, por ejemplo 5-15 cm/min, tal como 5-10 cm/min, por ejemplo 5-7.5 cm/min, tal como 7.5 cm/min. Este aumento de los regímenes de flujo, en comparación con los regímenes de flujo convencionales usados (particularmente para columnas de lecho compactados), puede ser posible, en gran medida debido al diámetro de partícula pequeño en conjunto con la alta densidad del adsorbente.

En una modalidad particular de la presente invención la aplicación de solución de proteína a la columna adsorbente puede realizarse con un régimen de flujo lineal de al menos 200 cm/hora, tal como al menos 300 cm/hora, con mayor preferencia al menos 400 cm/hora, tal como al menos 500 o 600 cm/hora, tal como al menos 900 cm/hora.

En una modalidad de la presente invención la columna puede comprender un adsorbente de alta densidad. En el presente contexto, el término "adsorbente de alta densidad" se refiere a parte del grupo de adsorbentes e implica el lecho completo de partículas adsorbentes presentes en la columna adsorbente. El término "partícula adsorbente" se usa de manera intercambiable con el término "partícula" y se refiere a las partículas únicas individuales que componen el adsorbente en la columna. La forma preferida de una partícula adsorbente única es sustancialmente esférica. La forma global de las partículas es, sin embargo, normalmente no muy crítica, así, las partículas pueden tener otros tipos de formas redondeadas, por ejemplo, formas elipsoide, gotita y de frijol. Sin embargo, para ciertas aplicaciones (por ejemplo, cuando se usan partículas en una configuración de lecho fluidizado), puede ser preferido que al menos 95% de las partículas sean sustancialmente esféricas. En el presente contexto los términos "diámetro de partícula" y "tamaño de partícula" se usan intercambiables y se refieren al diámetro de un círculo que puede estar hecho alrededor de la partícula y por lo tanto, se puede considerar como el diámetro de la partícula en la parte más ancha de la partícula.

La densidad de una partícula adsorbente denota describir la densidad de la partícula adsorbente en su estado completamente solvatado (por ejemplo hidratado) a diferencia de la densidad de un adsorbente seco. En la presente invención se puede medir la densidad de la partícula realizando el siguiente procedimiento: 1) drenar una muestra de partículas adsorbentes por succión suave sobre un filtro de vidrio al vacío para eliminar el agua intersticial que ocupa el espacio entre las cuentas individuales. 2) Pesar la muestra de partículas drenada para determinar la masa total de las partículas. 3) Añadir la cantidad total de muestra de partículas drenadas a una cantidad conocida de agua en un cilindro de medición y leer el aumento en el volumen total obtenido por la adición de las partículas drenadas. 4) Calcular la densidad dividiendo la masa total de las partículas drenadas con el aumento de volumen determinado en el punto 3.

En una modalidad de la presente invención la densidad de la partícula adsorbente puede estar en el intervalo de 1.5 g/ml a 20 g/ml, con mayor preferencia en el intervalo de 1.9-20, con mayor preferencia en el intervalo de 2.0 g/ml a 20 g/ml, con mayor preferencia en el intervalo de 2.1 g/ml a 20 g/ml, con mayor preferencia en el intervalo de 2.3 g/ml a 20 g/ml, aún con mayor preferencia en el intervalo de 2.5 g/ml a 20 g/ml, aún con mayor preferencia en el intervalo de 2.8 g/ml a 20 g/ml, por ejemplo en el intervalo de 2.9 g/ml a 20 g/ml, aún con mayor preferencia en el intervalo de 3.0 g/ml a 20 g/ml, aún con mayor preferencia en el intervalo de 3.5 g/ml a 20 g/ml, aún con mayor preferencia en el intervalo de 4 g/ml a 20 g/ml, aún con mayor preferencia en el intervalo de 5 g/ml a 20 g/ml, aún con mayor preferencia en el intervalo de 10 g/ml a 20 g/ml, aún con mayor preferencia en el intervalo de 15 g/ml a 20 g/ml, aún con mayor preferencia en el intervalo de 4 g/ml a 15 g/ml, aún con mayor preferencia en el intervalo de 4 g/ml a 10 g/ml, aún con mayor preferencia en el intervalo de 1.5 g/ml a 15 g/ml.

La densidad de la partícula adsorbente de EBA puede ser significativa para las regímenes de flujo aplicables en relación con el grado máximo de expansión del lecho adsorbente posible dentro de la columna de EBA típica (por ejemplo H/HO max 3-5) y puede ser al menos 1.5 g/ml, con mayor preferencia al menos 1.8 g/ml, aún con mayor preferencia al menos 1.9 g/ml, aún con mayor preferencia al menos 2.0 g/ml, aún con mayor preferencia al menos 2.1 g/ml, con la máxima preferencia al menos 2.3 g/ml, aún con mayor preferencia al menos 2.5 g/ml, aún con mayor preferencia al menos 2.8 g/ml, aún con mayor

preferencia al menos 2.9 g/ml, aún con mayor preferencia al menos 3.0 g/ml, aún con mayor preferencia al menos 3.5 g/ml para permitir una alta productividad del proceso.

5 En aún una modalidad de la presente invención 85% en volumen de las partículas individuales del adsorbente tienen un diámetro dentro del intervalo de 5 a 200 micras (μm), con mayor preferencia dentro del intervalo de 10 a 150 micras, aún con mayor preferencia dentro del intervalo de 35 a 120 micras, aún con mayor preferencia dentro del intervalo de 20 a 100 micras, aún con mayor preferencia dentro del intervalo de 20 a 80 micras, aún con mayor preferencia dentro del intervalo de 80 a 150 micras, y aún con mayor preferencia dentro del intervalo de 40 a 120 micras. En la presente invención el diámetro de partícula promedio del adsorbente es 150 micras o menor, preferentemente 120 micras o menor, aún con mayor preferencia 100 micras o menor, aún con mayor preferencia 80 micras o menor, aún con mayor preferencia 70 micras o menor, aún con mayor preferencia 60 micras o menor, aún con mayor preferencia 50 micras o menor, aún con mayor preferencia 40 micras o menor.

15 Varios parámetros que tienen una influencia en el régimen de flujo se pueden implementar en un proceso EBA. Las propiedades de fluidización de las partículas adsorbentes (que pueden ser descritos por la ayuda de la Ley de Stokes) determinan qué regímenes de flujo que se pueden aplicar para expandir el adsorbente y aún así mantener el adsorbente dentro de la columna. Los principales factores que influyen en esto son el diámetro y la densidad de las partículas adsorbentes en conjunto con la viscosidad del líquido que fluye a través de la columna. Sin embargo, las cinéticas de unión y transferencia de masa relacionados con una aplicación específica son igualmente importantes para garantizar la eficiencia y la productividad óptima del proceso EBA. Por ejemplo, puede ser posible correr en una columna EBA que contiene un cierto adsorbente EBA a muy altos regímenes de flujo en términos de las propiedades de fluidización y expansión física, mientras que el régimen de flujo alto aplicado resulta en una pobre e ineficiente adsorción (es decir, una capacidad dinámica baja), debido al hecho de que las moléculas objetivo que se enlazan no pueden difundir dentro y fuera de las partículas adsorbentes para coincidir con este régimen de flujo (es decir, la cinética de transferencia de masa es el factor limitante).

25 Por consiguiente, en una combinación de modalidades particularmente preferidas de la invención, donde el régimen de flujo lineal aplicado durante la aplicación de la solución de proteína está por encima de 300 cm/hora, el diámetro de partícula medio en volumen es de 150 μm o menos. Típicamente, en modalidades donde se realiza el proceso de fraccionamiento en un régimen de flujo lineal aplicado de por encima de 500 cm/min, el diámetro de partícula medio en volumen es más abajo de 120 μm , preferentemente más abajo de 90 μm . Típicamente, en modalidades donde el proceso de fraccionamiento se realiza en un régimen de flujo lineal aplicado de por encima de 600 cm/hora, el diámetro de partícula medio en volumen es preferentemente más abajo de 85 μm , con mayor preferencia más abajo de 75 μm .

35 Fundamentalmente la expresión de la distribución del tamaño de partícula en este contexto es el volumen sobre la base de la comprensión general en el campo de la técnica y como se describe por Malvern Instruments Ltd (Worcestershire, Reino Unido) en su guía de Operadores (MAN 0320 Edición 1.0, Marzo, 2004) a la Mastersizer 2000E, que describe la medición de la distribución de tamaño de partícula por la ayuda de dispersión de la luz.

40 Esto significa que, cuando el resultado indica, por ejemplo, que el 11% de una distribución está en la categoría de tamaño de 65-78 μm , esto significa que el volumen total de todas las partículas con diámetros en ese intervalo (dentro de la categoría de tamaño 65-78) representa 11 % del volumen total de todas las partículas en la distribución. El diámetro medio en volumen (o diámetro en volumen medio) referido en el presente contexto se refiere al diámetro medio en volumen marcado "D(4,3)" por Malvern para el Mastersizer 2000E. Cada vez que un intervalo de tamaño de partícula se refiere a tal como "las partículas tienen un diámetro de partícula en el intervalo de X-Y μm " esto denota que se entiende como al menos 90% del volumen total de partículas tienen un diámetro en el intervalo de X-Y μm , tal como al menos 95 %, por ejemplo al menos 98%, tal como al menos 99%.

50 Todavía en una modalidad de la presente invención la densidad del adsorbente, diámetro de partícula y el diámetro de partícula medio en volumen como se describió anteriormente se pueden combinar de cualquier manera posible para proporcionar el adsorbente más adecuado para el aislamiento de una o más proteína (s) de interés. En una modalidad de la presente invención la densidad del adsorbente puede estar en el intervalo de 1.5 a 10.0, 85% en volumen de las partículas individuales del adsorbente pueden tener un diámetro dentro del intervalo de 10 a 150 micras, y el diámetro de partícula medio en volumen puede estar en el intervalo de 15 a 100 micras. En otra modalidad de la presente invención la densidad del adsorbente puede estar en el intervalo de 2.0 a 5.0, 85% en volumen de las partículas individuales del adsorbente pueden tener un diámetro dentro del intervalo de 20 a 140 micras, y el diámetro de partícula medio en volumen puede estar en el intervalo de 55 a 85 micras. En aún una modalidad de la presente invención la densidad del adsorbente puede estar en el intervalo de 2.5 a 3.5, 85% en volumen de las partículas individuales del adsorbente pueden tener un diámetro dentro del intervalo de 40 a 120 micras, y el diámetro de partícula medio en volumen puede estar en el intervalo de 60 a 80 micras.

En una combinación de modalidades preferidas, cuando el diámetro de partícula medio en volumen puede ser 120 μm o menor, la densidad de partícula es al menos 1.6 g/ml, con mayor preferencia al menos 1.9 g/ml. Cuando el diámetro de partícula medio en volumen es menor que 90 μm la densidad debe ser al menos 1.8 g/ml o más preferible al menos 2.0 g/ml. Cuando el diámetro de partícula medio en volumen es menor que 75 μm la densidad debe ser al menos 2.0 g/ml, más preferible al menos 2.3 g/ml y más preferible al menos 2.5 g/ml.

En la presente invención la partícula adsorbente comprende una partícula con un diámetro de partícula medio en volumen de a lo máximo 150 μm y una densidad de partículas de al menos 1.5 g/ml, tal como una densidad de partículas de al menos 1.6 g/ml, por ejemplo una densidad de partículas de al menos 1.9 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 2.0 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 2.3 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 2.5 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 2.8; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 3.0 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 3.5 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 4.0 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 4.5 g/ml. Preferentemente, la partícula adsorbente comprende una partícula con un diámetro de partícula medio en volumen de a lo máximo 120 μm y una densidad de partículas de al menos 1.5 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 1.6 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 1.9 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 2.0 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 2.3 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 2.5 g/ml, por ejemplo una densidad de partículas de al menos 2.8; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 3.0 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 3.5 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 4.0 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 4.5 g/ml. Con mayor preferencia, la partícula adsorbente comprende una partícula con un diámetro de partícula medio en volumen de a lo máximo 100 μm y una densidad de partículas de al menos 1.5 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 1.6 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 1.9 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 2.0 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 2.3 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 2.5 g/ml, por ejemplo una densidad de partículas de al menos 2.8; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 3.0 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 3.5 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 4.0 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 4.5 g/ml. Aún con mayor preferencia, la partícula adsorbente comprende una partícula con un diámetro de partícula medio en volumen de a lo máximo 90 μm y una densidad de partículas de al menos 1.5 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 1.6 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 1.9 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 2.0 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 2.3 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 2.5 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 2.8; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 3.0 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 3.5 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 4.0 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 4.5 g/ml. Aún con mayor preferencia, la partícula adsorbente comprende una partícula con un diámetro de partícula medio en volumen de a lo máximo 75 μm y una densidad de partículas de al menos 1.5 g/ml, tal como una densidad de partículas de al menos 1.6 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 1.9 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 2.0 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 2.3 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 2.5 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 2.8; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 3.0 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 3.5 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 4.0 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 4.5 g/ml. Aún con mayor preferencia, la partícula adsorbente comprende una partícula con un diámetro de partícula medio en volumen de a lo máximo 50 μm y una densidad de partículas de al menos 1.5 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 1.6 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 1.9 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 2.0 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 2.3 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 2.5 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 2.8; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 3.0 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 3.5 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 4.0 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 4.5 g/ml. Aún con mayor preferencia, la partícula adsorbente comprende una partícula con un diámetro de partícula medio en volumen de a lo máximo 40 μm y una densidad de partículas de al menos 1.5 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 1.6 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 1.9 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 2.0 g/ml; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 2.3 g/ml; tal como una densidad de partículas de al menos 2.5 g/ml, por ejemplo una densidad de partículas de al menos 2.8; por ejemplo una densidad de partículas de al menos 3.0 g/ml, tal como una densidad de partículas de al menos 3.5 g/ml, por ejemplo una densidad de partículas de al menos 4.0 g/ml, tal como una densidad de partículas de al menos 4.5 g/ml.

La partícula adsorbente usada de acuerdo con la invención debe ser al menos parcialmente permeable a la sustancia biomolecular que se aísla para garantizar una capacidad de unión significativa en contraste con partículas impermeables que sólo se pueden enlazar la molécula objetivo en su superficie resultando en capacidad de unión relativamente baja. La partícula adsorbente puede estar en una matriz de diferentes estructuras, composiciones y formas.

5 La alta densidad de la partícula adsorbente se logra, en gran medida por la inclusión en una fase de polímero poroso, de una cierta proporción de un material de núcleo no poroso denso. El núcleo no poroso preferentemente tiene una densidad de al menos 4.0 g/ml, tal como al menos 5.0 g/ml, por ejemplo al menos 8.0 g/ml, tal como al menos 10 g/ml, por ejemplo al menos 15 g/ml. Típicamente, el material de núcleo no poroso tiene una densidad en el intervalo de aproximadamente 4.0-25 g/ml, tal como aproximadamente 4.0-20 g/ml, por ejemplo aproximadamente 4.0-15 g/ml, tal como 12-19 g/ml, por ejemplo 14-18 g/ml, tal como aproximadamente 6.0-15.0 g/ml, por ejemplo aproximadamente 6.0-10 g/ml.

10 Otros tipos de partículas adsorbentes de alta densidad se basan en partículas hechas de un material poroso de alta densidad, tal como óxido de zirconio, en el que los ligandos con poros para la adsorción se pueden inmovilizar ya sea directamente al material de alta densidad o a las redes de polímeros porosos cargados en los poros del material de alta densidad, ver por ejemplo US 6,036,861 y WO 99/51316. A pesar de ser una forma atractiva de proporcionar una partícula adsorbente de alta y pequeña densidad tales tipos de adsorbentes tendrán generalmente algunos inconvenientes debido a la restricción de la difusión en la estructura porosa y un contenido de volumen alto de la fase de alta densidad resultando en volúmenes bajos de unión de la proteína accesible.

15 Es de importancia central para una amplia variedad de modalidades preferidas de la invención que la partícula adsorbente empleada de acuerdo a la invención tiene un volumen alto de unión de la proteína accesible. En el presente contexto, el término "volumen de unión de la proteína accesible de la partícula" se refiere al volumen relativo de poro de cualquier tipo de partícula específico, y se expresa como porcentaje en volumen con relación al volumen de la cuenta completa (es decir, el volumen ocupado por los poros/el volumen total de la cuenta x 100 %). Así si se ocupa demasiado del volumen de la partícula por el material de alta densidad solamente pueden lograrse productividades baja de la columna.

20 En una modalidad de la presente invención el volumen de unión de la proteína accesible de la partícula del adsorbente puede ser al menos 20%, con mayor preferencia al menos 30%, aún con mayor preferencia al menos 40%, aún con mayor preferencia al menos 50%, aún con mayor preferencia al menos 55%, aún con mayor preferencia al menos 60%, aún con mayor preferencia al menos 65%, aún con mayor preferencia al menos 70%, aún con mayor preferencia al menos 75%, aún con mayor preferencia al menos 80%, aún con mayor preferencia al menos 85% y aún con mayor preferencia al menos 90%.

25 En una modalidad de la presente invención el adsorbente puede tener una capacidad de unión dinámica a 10 % de saturación para dicha al menos una proteína específica de al menos 5 g por litro de adsorbente sedimentado, con mayor preferencia al menos 10 g por litro, aún con mayor preferencia al menos 15 g por litro, aún con mayor preferencia al menos 20 g por litro, aún con mayor preferencia al menos 25 g por litro, aún con mayor preferencia al menos 30 g por litro, aún con mayor preferencia al menos 35 g por litro, aún con mayor preferencia al menos 40 g por litro, aún con mayor preferencia al menos 50 g/litro, aún con mayor preferencia al menos 60 g/litro.

30 Cuando la solución de proteína se añade a la columna adsorbente la relación entre la partícula adsorbente presente en la columna y la solución de proteína se puede optimizar para mantener una capacidad alta del adsorbente y obtener una pureza alta de la proteína o proteínas que se asilan. En una modalidad preferida de la presente invención el adsorbente presente en la columna con relación a la solución de proteína a cargarse en la columna se proporcionan a una relación de al menos 1:100, tal como al menos 1:50, por ejemplo al menos 1:30, tal como al menos 1:15, por ejemplo 1:10, tal como 1:5, tal como 1:1, tal como 1:0,5 medido en una base volumen/volumen.

35 Así, las partículas adsorbentes pueden estar constituidas por una serie de materiales porosos derivatizados químicamente que tienen la densidad necesaria, diámetro y/o capacidad de unión para operar per se a los regímenes de flujo. Las partículas son cualquiera del tipo conglomerado, como se describió en WO 92/00799, que tiene al menos dos núcleos no porosos rodeados por un material poroso, o del tipo pelicular que tiene un solo núcleo no poroso rodeado por un material poroso.

40 En el presente contexto, el término " tipo conglomerado" se refiere a una partícula de un material particulado, que comprende cuentas de material del núcleo de diferentes tipos y tamaños, mantenidos juntos por la matriz de base polimérica, por ejemplo una partícula de núcleo que consiste de dos o más partículas de alta densidad mantenidos juntos por una matriz de base polimérica circundante (por ejemplo agarosa).

45 En el presente contexto, el término " tipo pelicular" se refiere a un compuesto de partículas, en donde cada partícula consiste de solamente un material de núcleo de alta densidad recubierto con una capa de matriz de base polimérica porosa, por ejemplo una cuenta de acero inoxidable de alta densidad recubierta con agarosa.

En consecuencia, el término "al menos un núcleo no poroso de alta densidad" se refiere a ya sea un núcleo pelicular, que comprende una partícula no porosa de alta densidad única o se refiere a un núcleo de conglomerado que comprende más de una partícula no porosa de alta densidad.

5

La partícula adsorbente, como se indica, comprende un núcleo no poroso de alta densidad con un material poroso que rodea el núcleo, y dicho material poroso que comprende opcionalmente un ligando en su superficie exterior.

En el presente contexto, el término "núcleo" se relaciona con la partícula de núcleo no poroso o partículas del núcleo que están presentes dentro de la partícula adsorbente. La partícula del núcleo o partículas del núcleo se pueden distribuir incidental dentro del material poroso y no se limita a ser situada en el centro de la partícula adsorbente.

El núcleo no poroso constituye típicamente de a lo máximo 70 % del volumen total de la partícula adsorbente, tal como a lo máximo 60 %, preferentemente a lo máximo 50 %, preferentemente a lo máximo 40 %, preferentemente a lo máximo 30 %, preferentemente a lo sumo 20 %, preferentemente a lo máximo 15 %, preferentemente a lo máximo 10 %, preferentemente a lo máximo 5 % .

Ejemplos de materiales de núcleo no poroso adecuados son los compuestos inorgánicos, metales, metales pesados, no metales elementales, óxidos metálicos, óxidos no metálicos, sales de metales y aleaciones metálicas, etc., siempre y cuando se cumplan los criterios de densidad anteriores. Los ejemplos de tales materiales de núcleo son silicatos metálicos borosilicatos metálicos; cerámicas que incluyen diboruro de titanio, carburo de titanio, diboruro de zirconio, carburo de zirconio, carburo de tungsteno, carburo de silicio, nitruro aluminico, nitruro de silicio, nitruro de titanio, óxido de itrio, polvo de silicio metálico, y disiluro de molibdeno; óxidos y sulfuros de metal, que incluyen óxido de magnesio, aluminio, titanio, vanadio, cromo, zirconio, hafnio, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre y plata; óxidos no metálicos; sales de metal, que incluyen sulfato bórico; elementos metálicos, que incluyen tungsteno, zirconio, titanio, hafnio, vanadio, cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, indio, cobre, plata, oro, paladio, platino, rutenio, osmio, rodio e iridio, y aleaciones de elementos metálicos, tales como aleaciones formadas entre dichos elementos metálicos, por ejemplo acero inoxidable; formas cristalinas y amorfas de carbón, que incluyen grafito, negro de carbón y carbón. Los materiales de núcleo no porosos preferidos son cuentas de carburo de tungsteno, tungsteno, acero y titanio tales como cuentas de acero inoxidable.

30

El material poroso es una matriz de base polimérica usada como un medio para cubrir y mantener materiales de núcleo múltiples (o uno solo) juntos y dentro de la partícula adsorbente y como un medio para la unión del ligando de adsorción.

La matriz de base polimérica puede buscarse entre ciertos tipos de polímeros orgánicos naturales o sintéticos, típicamente seleccionados de i) polisacáridos naturales o sintéticos y otros polímeros basados en carbohidratos, que incluyen agar, alginato, carragenina, goma de guar, goma arábica, goma de Anogeissus latifolia, goma de tragacanto, goma karaya, goma de algarrobo, goma de xantano, agarosas, celulosas, pectinas, mucinas, dextranas, almidones, heparinas, quitosanas, hidroxí almidones, hidroxipropilo almidones, carboximetil almidones, hidroxietilo celulosas, hidroxipropilo celulosas, y carboximetil celulosas; ii) polímeros y monómeros orgánicos sintéticos que resultan en polímeros, que incluyen polímeros acrílicos, poliamidas, poliimidias, poliésteres, poliéteres, compuestos vinílicos poliméricos, polialquenos, y derivados sustituidos de estos, así como también copolímeros que comprende más de uno de esos polímeros funcionalmente, y derivados sustituidos de estos; y iii) mezcla de estos.

40

Un grupo preferido de matrices de base polimérica son los polisacáridos tal como agarosa.

45

Los investigadores de la presente invención han encontrado que para garantizar una adsorción eficiente a regímenes de flujo altos es necesario minimizar el diámetro de partícula medio en volumen de la partícula adsorbente. Así, en la presente invención la partícula adsorbente tiene un diámetro de partícula medio en volumen de a lo máximo 150 μm , típicamente un diámetro de partícula medio en volumen en el intervalo de aproximadamente 40 μm a 150 μm . La partícula adsorbente típicamente tiene un diámetro de partícula medio en volumen de a lo máximo 120 μm , particularmente a lo máximo 100 μm , con mayor preferencia a lo máximo 90 μm , 80 μm o 75 μm , con mayor preferencia a 70 μm y con la máxima preferencia a lo máximo 60 μm .

50

Desde un punto de vista de la productividad, es importante que el adsorbente sea capaz de unir una cantidad alta de la sustancia biomolecular por unidad de volumen de adsorbente. Así, hemos encontrado que es preferible aplicar adsorbentes que tienen una fase polimérica (es decir, la red polimérica permeable donde un ligando se posiciona y donde la adsorción real está teniendo lugar) que constituye al menos 50 % del volumen de la partícula adsorbente, preferentemente al menos

55

70 %, con mayor preferencia al menos 80 % y con la máxima preferencia al menos 90% del volumen de partículas adsorbentes.

El ligando.

5

El proceso de aislamiento de una o más proteína (s) se puede proporcionar y facilitar uniendo un ligando adecuado al adsorbente. En una modalidad de la presente invención el adsorbente comprende un polímero de la matriz funcionalizado que porta una pluralidad de ligandos que comprende grupos funcionales unidos covalentemente. En una modalidad preferida de la presente invención el ligando comprende un sistema de anillo aromático o heteroaromático y uno o más grupos ácidos.

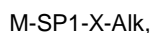
10

En el presente contexto, el término "polímero de la matriz funcionalizado" se refiere al sitio de anclaje del ligando que promueve las características deseadas de adsorción de proteínas. Dependiendo de la estructura de la partícula adsorbente del polímero de la matriz puede formar el esqueleto o estructura que define la forma física de la partícula adsorbente o puede ser un polímero que está ocupando los poros de otro material que sirve como el esqueleto o estructura de la partícula. En modalidades preferidas, el polímero de matriz funcionalizado es un polímero orgánico sintético o natural, tal como un polisacárido (por ejemplo, polímeros poli- acrílicos, agarosa o celulosa), o puede ser un polímero inorgánico, tal como sílice. En casos especiales el propio polímero de la matriz puede constituir el sitio de la adsorción de proteína en cuyo caso no es necesario inmovilizar ligandos adicionales sobre el polímero.

15

En una modalidad de la presente invención el adsorbente comprende un polímero de la matriz funcionalizado que porta una pluralidad de grupos funcionales unidos covalentemente, dichos grupos que tienen la fórmula general:

20



25

en donde M designa el polímero adsorbente ; SP1 designa un separador opcional opcionalmente sustituido con -A-SP2-ACID, -A, o -ACID; X designa -O-, -S-, -H-, o-NAlk-; Alk puede estar ausente, -A-SP2-ACID, -A, -ACID o C₁₋₄ alquilo, donde C₁₋₄ alquilo puede ser opcionalmente sustituido con -A-SP2-ACID, -A, o -ACID; A designa una porción aromática o heteroaromática opcionalmente sustituida; SP2 designa un separador opcional; y ACID designa uno o más grupos ácidos; en donde al menos uno de SP1 o Alk está sustituido con -A-SP2-ACID o -A, y al menos uno de SP1 o Alk comprende -ACID y en donde al menos uno de SP1 o Alk está presente. Si Alk está ausente, X estará además ausente.

30

En una modalidad de la presente invención el adsorbente puede acoplarse con un ligando que porta una carga positiva a un valor de pH a pH 10 o inferior, tal como pH 9 o inferior, por ejemplo pH 8 o inferior, tal como pH 7 o inferior, por ejemplo pH 6 o inferior, tal como pH 5 o inferior, por ejemplo pH 4 o inferior.

35

Además se ha encontrado que los grupos funcionales no deben ser demasiado grandes en tamaño y complejidad, para obtener una capacidad de unión alta y una estabilidad química alta del adsorbente. Así se ha encontrado que un tamaño más grande en términos de peso molecular y número de sistemas de anillo presentes en el grupo funcional en muchos casos solamente aumentan el costo del adsorbente sin dar el beneficio de una mayor capacidad de unión en términos de la cantidad de proteína que se puede enlazar por litro de adsorbente. Además la concentración molar del grupo funcional unido covalentemente alcanzable en el adsorbente puede ser menor si se emplea un tamaño molecular grande del grupo funcional (presumiblemente debido al impedimento estérico).

40

Así, en una modalidad de la invención, los grupos funcionales unidos covalentemente comprenden un máximo de tres sistemas de anillo aromáticos mono-o bicíclicos o heteroaromáticos para cada grupo funcional unido a cada polímero de la matriz, con mayor preferencia un máximo de dos sistemas de anillo aromáticos mono-o bicíclicos o heteroaromáticos y aun con mayor preferencia un máximo de un sistema de anillo aromático mono-o bicíclico o heteroaromático para cada grupo funcional unido a la matriz de polímero. Asimismo, en una modalidad de la invención, los grupos funcionales unidos covalentemente comprenden un máximo de tres grupos ácidos, preferentemente un máximo de 2 grupos ácidos y con la máxima preferencia un máximo de un grupo ácido unido a cada sistema de anillos aromático o heteroaromático presente en los grupos funcionales unidos covalentemente.

45

50

En una modalidad preferida de la invención, uno o más grupos ácidos se eligen del grupo de ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, ácidos fosfónicos, ácidos borónicos y combinaciones del mismo.

55

En una modalidad de la presente invención el ligando puede ser derivado de un grupo dietilaminoetilo, una imina de polialquileno, un alquil-amina, un alqui-diamina o una polialilamina. Preferentemente, pueden ser adecuados alquil-amina o

alquil-diamina que tienen una longitud de cadena de 3-14 átomos y 1-5 grupos amino funcionales. Los átomos para formar parte de la cadena pueden implicar C (carbono), N (nitrógeno), O (oxígeno) y/o S (azufre).

5 En aún una modalidad de la presente invención el adsorbente puede comprender un ligando, que tiene ambos grupos aromáticos y grupos amino tales como una amina aromática o una diamina aromática. Preferentemente, la diamina aromática es 1,4-xileno-diamina o isómeros de 1,4-xileno-diamina.

10 En aún una modalidad de la presente invención el adsorbente se puede acoplar con un ligando que tiene un grupo ácido, una porción aromática o heteroaromática, un grupo heteroaromático bicíclico sustituido o cualquier combinación del mismo, tal como un ligando que tiene un grupo ácido y una porción aromática o heteroaromática, un ligando que tiene un grupo ácido y un grupo heteroaromático bicíclico sustituido o una porción aromática o heteroaromática y un grupo heteroaromático bicíclico sustituido.

15 En otra modalidad de la presente invención el ligando comprende un grupo heteroaromático bicíclico sustituido que se puede derivar a partir de compuestos seleccionados del grupo que consiste de bencimidazoles, benzotiazoles, y benzoxazoles.

20 En una modalidad de la presente invención el ligando puede ser un ácido aromático o heteroaromático seleccionado del grupo que consiste de ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, ácidos fosfónicos, y ácidos borónicos. Preferentemente, el ligando puede seleccionarse del grupo que consiste de ácido 2-mercaptobenzoico, ácido 2-mercaptonicotínico, ácido 2-aminobenzoico, ácido 3-aminobenzoico, y ácido 4-aminobenzoico, ácido 4-hidroxifenilo-mercapto-acético, ácido 4-hidroxifenilo-mercapto-propiónico, ácido 4-hidroxifenilo-mercapto-butanoico, ácido 2,3 - dihidroxi-benzoico, ácido 2,4 dihidroxi-benzoico, ácido 2,5 di-hidroxi-benzoico, ácido 2,6 dihidroxi-benzoico, ácido 3,4-dihidroxi-benzoico, ácido 3,5-dihidroxi-benzoico, ácido mercaptobencimidazol sulfónico, ácido ortanílico, ácido metanílico, ácido sulfanílico, ácido 4-metilanilina-2-sulfónico, ácido 4-metoxianilina-2-sulfónico, ácido anilina-2,5-disulfónico, ácido N-metilmetanílico, ácido 7-amino-1-naftol-3-sulfónico, ácido 1-naftol-4-sulfónico, ácido 2-naftol-6-sulfónico y ácido 2-hidroxi-3-naftoico, y ácido 2-mercaptobencimidazol-sulfónico.

30 En una modalidad de la presente invención el ligando puede ser un aminoácido N-benzoil o un aminoácido N-benzoil que comprende grupos tiol o mercapto.

En aún una modalidad de la presente invención el ligando se puede acoplar al adsorbente a través de un enlace tio-éter, un enlace de amina, o un enlace oxígeno-éter.

35 La concentración óptima de los grupos funcionales unidos covalentemente (los ligandos) sobre el esqueleto adsorbente polimérico (frecuentemente referido además como la densidad de grupos funcionales o la concentración de ligando) dependerá de la estructura detallada del grupo funcional y el tipo de material adsorbente usado para preparar el adsorbente.

40 Para garantizar una fuerza de adsorción óptima y productividad del adsorbente, se ha encontrado que la concentración de ligando en el adsorbente puede ser significativa. Así, en una modalidad adecuada, el adsorbente porta ligandos para la adsorción de las sustancias biomoleculares en una concentración de al menos 20 mM, tal como al menos 30 mM o al menos 40 mM, preferentemente al menos 50 mM y con la máxima preferencia al menos 60 mM

45 Sin embargo, generalmente se prefiere que el adsorbente tiene una concentración de grupos funcionales unidos covalentemente en el intervalo de 5 a 500 milimoles por litro de adsorbente en su estado de lecho sedimentado (compactado), con mayor preferencia en el intervalo de 10-250 milimoles por litro, aún con mayor preferencia en el intervalo de 10-125 milimoles por litro, aún con mayor preferencia en el intervalo 15 - 100 milimoles por litro, aún con mayor preferencia en el intervalo 20 a 80 milimoles por litro aún con mayor preferencia en el intervalo de 25 a 75 milimoles por litro aún con mayor preferencia en el intervalo de 30 a 60 milimoles por litro.

50 En una modalidad de la presente invención los grupos funcionales unidos covalentemente se pueden enlazar al adsorbente por cualquier tipo de enlace covalente conocido per se que es aplicable para este propósito, ya sea por una reacción química directa entre el ligando y el adsorbente o por una activación precedente del adsorbente o del ligando con un reactivo adecuado conocido per se haciendo posible enlazar el esqueleto de la matriz polimérica y el grupo funcional. Ejemplos de tales reactivos activadores adecuados son epiclorhidrina, epibromhidrina, glicidiléter de alilo; bis- epóxidos tal como butanodiolglicidiléter, compuestos alifáticos sustituidos con halógeno tales como di-cloro-propanol, carbonildiimidazol; aldehídos tal como dialdehído glutárico; quinonas; peryodatos tal como sodio-meta-peryodato; carbodiimidias; cloruros de sulfonilo tales como cloruros de tosilo y cloruros tresilo; N- hidroxi succinimidias; 2-fluoro-1-metilpiridinio tolueno-4-

sulfonatos; oxazolonas; maleimidias; disulfuros de piridilo e hidrazidas. Entre estos, se prefieren los reactivos de activación que dejan un grupo espaciador SP1 diferente a partir de un enlace sencillo, por ejemplo epiclorhidrina, epibromhidrina, alil-glicidiléter; bis-epóxidos, compuestos alifáticos sustituidos con halógeno; aldehídos; quinonas; bromuro de cianógeno; cloro-triazinas; oxazolonas; maleimidias; disulfuros de piridilo; e hidrazidas.

Reactivos de activación especialmente interesantes son los compuestos con epoxi tales como epiclorhidrina, alil-glicidiléter y butanodioldiglicidiléter y poliglicidiléteres tal como glicerol poliglicidiléter. En ciertos casos en donde la estabilidad de la unión covalente del grupo funcional puede demostrarse que es estable al tratamiento con hidróxido de sodio por ejemplo 0.1 M a 2 M de hidróxido de sodio del reactivo de activación puede estar basado en reactivos derivados de triazina por ejemplo cloro-triazinas tal como cloruro cianúrico.

Las posibilidades mencionadas anteriormente hacen que sea importante definir la presencia de un separador opcional SP1 que recubre el esqueleto adsorbente polimérico (referido además como el polímero de la matriz) y el grupo funcional. En el presente contexto, el espaciador SP1 se puede considerar como parte del reactivo de activación, que forma el enlace entre el polímero de la matriz y el grupo funcional. Así, el espaciador SP1 corresponde a los reactivos de activación y las reacciones de acoplamiento implicadas. En algunos casos, cuando se usa por ejemplo carbodiimidias, el reactivo activador forma una forma activada del polímero de la matriz o del reactivo del grupo funcional. Después del acoplamiento no se quedan partes del reactivo de activación entre el grupo funcional y el polímero de la matriz, y así, SP1 es simplemente un enlace sencillo.

En otros casos, el espaciador SP1 puede ser una parte integral del grupo funcional que efectúa las características de unión, es decir, el grupo funcional, y esto será especialmente significativo, si el espaciador SP1 comprende sitios funcionalmente activos o sustituyentes tales como tioles, aminas, grupos ácidos, grupos sulfona, grupos nitro, grupos hidroxilo, grupos nitrilo u otros grupos capaces de interactuar a través de enlaces de hidrógeno, enlaces electrostáticos o repulsión, transferencia de carga o similares.

En aún otros casos, el espaciador SP1 puede comprender un anillo aromático o heteroaromático, que desempeña un papel importante para las características de unión del adsorbente. Este sería por ejemplo el caso si quinonas o clorotriazinas donde se usan como agentes de activación para el adsorbente o el grupo funcional. En un caso adicional, el espaciador SP1 puede ser un enlace sencillo o un birradical derivado a partir de un reactivo de activación seleccionado de epiclorhidrina, alil-glicidiléter, bromuro de alilo, bis-epóxidos tal como butanodioldiglicidiléter, compuestos alifáticos sustituidos con halógeno tal como 1,3- Dicloropropano-2-ol, aldehídos tal como dialdehído glutárico, quinonas, bromuro de cianógeno, cloro -triazinas tal como cloruro cianúrico, 2-fluoro-1-metilpiridinio tolueno-4-sulfonatos, maleimidias, oxazolonas e hidrazidas.

En una modalidad de la presente invención el espaciador SP1 puede ser un birradical alifático de cadena corta, por ejemplo que tiene la fórmula: $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ (derivado de epiclorhidrina), $-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ (derivado de alil-glicidiléter) o $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ (derivado de butano-dioldiglicidiléter; o un enlace sencillo.

En una modalidad de la presente invención los adsorbentes típicamente comprenden un ligando que comprende grupos aromáticos o heteroaromáticos (radicales) seleccionados de los grupos que comprenden i) ligandos que comprenden los siguientes tipos como grupos funcionales: ácidos benzoicos tales como ácidos 2-aminobenzoico, ácidos 3-aminobenzoico, ácidos 4-aminobenzoico, ácidos 2-mercaptobenzoico, ácido 4-amino-2-clorobenzoico, ácido 2-amino-5-clorobenzoico, ácido 2-amino-4-clorobenzoico, ácidos 4-aminosalicílico, ácidos 5-aminosalicílico, ácidos 3,4 -diaminobenzoico, ácido 3,5-diaminobenzoico, ácido 5-aminoisoftálico, ácido 4-aminoftálico; ácidos cinámicos tal como ácidos hidroxilo - cinámico; ácidos nicotínicos tal como ácidos 2-mercaptonicotínico; ácidos naftoico tal como 2-hidroxilo-1-naftoico; quinolinas tal como 2-mercaptoquinolina; ácidos tetrazolacético tal como ácido 5-mercapto-1-tetrazolacético; tiadiazoles tal como 2 -mercapto-5-metil-1,3,4-tiadiazol; bencimidazoles tales como 2-amino-bencimidazol, 2-mercaptobenzimidazol, y 2 -mercapto-5-nitrobencimidazol; benzotiazoles tales como 2 -aminobenzotiazol, 2-amino-6-nitrobenzotiazol, 2-mercaptobenzotiazol y 2-mercapto-6-etoxibenzotiazol; benzoxazoles tal como 2-mercaptobenzoxazol; tiofenoles tales como tiofenol y 2-aminotiofenol; ácido 2-(4-aminofeniltio) acético; ácidos sulfónicos aromáticos o heteroaromáticos y ácidos fosfónicos, tal como ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico y fenoles tales como 2-amino-4-nitro-fenol. Se debería señalar que el caso donde M es agarosa, SP1 se deriva de vinil sulfona, y L es ácido 4-aminobenzoico que puede ser excluido específicamente en relación con las matrices de fase sólida de acuerdo con la invención, cf. WO 92/16292, con la máxima preferencia ácidos aminobenzoico como ácido 2-amino-benzoico, ácido 2-mercapto-benzoico, ácido 3-aminobenzoico, ácido 4-aminobenzoico, ácido 4-amino-2-clorobenzoico, ácido 2-amino-5-clorobenzoico, ácido 2-amino-4-clorobenzoico, ácidos 4-aminosalicílico, ácidos 5-aminosalicílicos, ácidos 3,4-diaminobenzoico, ácido 3,5-diaminobenzoico, ácido 5-5-aminoisoftálico, ácido 4-aminoftálico. Generalmente, el acoplamiento usando divinil sulfona puede no ser adecuado debido a que el acoplamiento

divinil sulfona es inestable cuando contacta con un alcalino y como los alcalinos son actualmente los más adecuados y usan agentes de limpieza, adsorbentes acoplados con divinil sulfona no se consideran de importancia industrial, ii) ligandos que comprenden ácidos 2-hidroxi-cinámico, ácido 3-hidroxi-cinámico y ácido 4-hidroxi-cinámico III) ligandos que comprenden un ácido carboxílico y un grupo amino como sustituyentes tales como ácido 2-amino-nicotínico, ácido 2-mercapto-nicotínico, ácido 6-amino-nicotínico y ácido 2-amino-4-hidroxipirimidina-carboxílico iv) ligandos que comprenden radicales derivados de un anillo de benceno fusionado con un sistema de anillo heteroaromático, por ejemplo un ligando seleccionado de bencimidazoles tales como 2-mercapto-bencimidazol y 2-mercapto-5-nitro-bencimidazol; benzotiazoles tales como 2-amino-6-nitrobenzotiazol, 2-mercaptobenzotiazol y 2-mercapto-6-etoxibenzotiazol; benzoxazoles tal como 2-mercaptobenzoxazol, y v) ligandos seleccionados del grupo de tiofenoles tal como tiofenol y 2-aminotiofenol .

Dentro de la modalidad en donde el ligando se selecciona del grupo i) -v) mencionado anteriormente, los adsorbentes tienen típicamente una capacidad de unión dinámica de al menos 10 g de sustancia biomolecular por litro, con mayor preferencia al menos 20 g por litro, todavía más preferible al menos 30 g por litro cuando se prueba de acuerdo con las condiciones de proceso usadas en la aplicación relevante. La capacidad de unión del adsorbente se puede determinar en términos de su capacidad de unión a la albúmina de suero bovino (BSA). La capacidad de unión es típicamente tal que al menos 10 g/L de BSA se une de acuerdo con el Método de prueba A .

Método A

El método A es un método usado para la determinación de la capacidad de unión a la albúmina bovina de adsorbentes seleccionados que consisten del siguiente proceso:

Solución de albúmina de suero bovino pH 4.0 (BSA pH 4.0): la albúmina de suero bovino purificada (A 7906, Sigma, Estados Unidos) se disuelve a una concentración final de 2 mg/ml en 20 mM de citrato de sodio pH 4.0. Los adsorbentes se lavan con 50 volúmenes de 20 mM citrato de sodio pH 4.0 y drenan en un filtro de succión.

Una muestra de 1.0 ml de adsorbente drenado por succión se coloca en un tubo de ensayo de 50 ml seguido por la adición de 30 ml de BSA, pH 4.0.

El tubo de ensayo se cierra después con un tapón y la suspensión se incuba en un mezclador de rodillos por 2 horas a temperatura ambiente (20-25°C). El tubo de ensayo se centrifuga después por 5 min. a 2000 rpm para sedimentar completamente el adsorbente. El sobrenadante se aísla después del adsorbente pipeteando en un tubo de ensayo por separado, evitando el arrastre de cualquier partículas adsorbentes y se filtra a través de un pequeño filtro no-adsorbente de 0.2 micras (Millipore, Estados Unidos) Después de esto se realiza una determinación de la concentración de BSA no enlazada en el sobrenadante midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm en un espectrofotómetro.

La cantidad de BSA enlazada al adsorbente se calcula después de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Mg BSA enlazado por ml de adsorbente drenado por succión} = (1 - (\text{DO del sobrenadante de prueba} / \text{DO de solución inicial de BSA})) \times 60 \text{ mg BSA/ml adsorbente.}$$

Los parámetros del proceso

Como se mencionó anteriormente la solución de proteína que comprende una o más proteína (s) de interés se puede ajustar para tener un pH preestablecido y una fuerza iónica o conductividad preestablecida.

En el presente contexto, el término "preestablecido" se refiere al ajuste del pH, fuerza iónica o conductividad, respectivamente, a un valor específico y predeterminado para el propósito de seleccionar la capacidad del adsorbente para la unión de una o más proteína (s) de interés y aumentar de ese modo la eficiencia del adsorbente para el aislamiento de la(s) proteína (s).

En una modalidad de la presente invención el pH preestablecido está en el intervalo de pH 3.0 a pH 10.0, preferentemente en el intervalo de pH 4 a pH 9, con mayor preferencia en el intervalo de pH 4 a pH 8, aún con mayor preferencia en el intervalo de pH 4 a pH 7, aún con mayor preferencia en el intervalo de pH 4 a pH 6, aún con mayor preferencia en el intervalo de pH 4.5 a pH 5.5 o en el intervalo de pH 4 a pH 10, preferentemente en el intervalo de pH 5 a pH 9, con mayor preferencia en el intervalo de pH 6 a pH 9, aún con mayor preferencia en el intervalo de pH 6 a pH 8.

En aún una modalidad de la presente invención la fuerza iónica preestablecida está en el intervalo de 0.0001 a 12.0, preferentemente en el intervalo de 0.0001 a 5, con mayor preferencia en el intervalo de 0.0001 a 1, aún con mayor preferencia en el intervalo de 0.0001 a 0.1, aún con mayor preferencia en el intervalo de 0.0001 a 0.075, aún con mayor preferencia en el intervalo de 0.01 a 0.05 o en el intervalo de 0.1 a 12.0, preferentemente en el intervalo de 0.5 a 12, con mayor preferencia en el intervalo de 1 a 12, aún con mayor preferencia en el intervalo de 1.5 a 12, aún con mayor preferencia en el intervalo de 2 a 12, aún con mayor preferencia en el intervalo de 4 a 12.

En otra modalidad de la presente invención la conductividad preestablecida está en el intervalo de 0.01 a 1000 mS/cm, preferentemente en el intervalo de 0.01 a 200 mS/cm, con mayor preferencia en el intervalo de 0.05 a 100 mS/cm, con mayor preferencia en el intervalo de 0.1 a 50 mS/cm, con mayor preferencia en el intervalo de 0.5 a 20 mS/cm, con mayor preferencia en el intervalo de 1.0 a 10 mS/cm, aún con mayor preferencia en el intervalo de 1.0 a 5 mS/cm o en el intervalo de 10 a 1000 mS/cm, preferentemente en el intervalo de 100 a 1000 mS/cm, con mayor preferencia en el intervalo de 200 a 1000 mS/cm, con mayor preferencia en el intervalo de 300 a 1000 mS/cm, con mayor preferencia en el intervalo de 400 a 1000 mS/cm, con mayor preferencia en el intervalo de 500 a 1000 mS/cm, aún con mayor preferencia en el intervalo de 600 a 1000 mS/cm, con mayor preferencia en el intervalo de 2.0 a 15 mS/cm, con mayor preferencia en el intervalo de 2.0 a 12 mS/cm, aún con mayor preferencia en el intervalo de 2.0 a 10 mS/cm.

La fuerza iónica y la conductividad de las soluciones de proteínas de acuerdo con la presente invención son entidades relacionadas en que ambas entidades son funciones de la concentración de iones en la solución. Existe, sin embargo, una correspondencia teórica no directa entre ellas.

Cuando se considera una solución que contiene iones, es relativamente fácil para la persona con experiencia en la técnica calcular la cantidad de por ejemplo una sal inorgánica necesaria para lograr una cierta fuerza iónica. A la inversa, cuando la persona con experiencia en la técnica se enfrenta con el problema de determinar la fuerza iónica sin saber la cantidad de sal añadida, es difícil hacer una evaluación precisa ya que la fuerza iónica es una entidad teórica calculada a partir de tanto la concentración de iones como la carga de los iones. En esta situación es considerablemente más fácil para la persona con experiencia en la técnica medir la conductividad. Por estas razones, los términos "fuerza iónica" y "conductividad" se usan en el presente contexto para caracterizar las mismas condiciones. Cuando se hace referencia a los intervalos preferidos de estas dos entidades, sin embargo, no se pretende decir que existe alguna correspondencia entre los límites inferiores, o superiores indicados de la fuerza iónica y la conductividad, respectivamente.

Para obtener una o más proteína (s) del adsorbente uno o más proteína (s) se pueden eluir con uno o más tampón (es). Opcionalmente, el adsorbente se puede lavar con un tampón de lavado antes de que se someta al tampón de elución. En una modalidad de la presente invención el adsorbente se lava con un tampón de lavado para lavar el material no enlazado antes de eluir una o más proteína (s) del adsorbente.

Eliminación de Virus

Para aumentar las medidas de seguridad necesarias para prevenir propagar enfermedades virales a partir de donantes de sangre a los destinatarios de los productos de la sangre puede ser necesario introducir una o más etapas de eliminación de virus.

En una modalidad de la presente invención la solución de proteína se puede someter a al menos un tratamiento de eliminación de virus. Preferentemente, al menos un tratamiento de eliminación de virus se puede realizar antes de contactar la solución de proteína con el adsorbente.

El tratamiento de eliminación de virus puede implicar la adición de un detergente y/o un disolvente orgánico, tal como Tween, Tritón, tri-n - butilfosfato, a la solución de proteína.

En una modalidad de la presente invención varias etapas de eliminación de virus se pueden realizar y, preferentemente, se puede realizar un tratamiento de eliminación de virus antes de contactar la solución de proteína con el adsorbente.

En una modalidad de la presente invención varias etapas de eliminación de virus se pueden realizar y, preferentemente, se realiza un tratamiento de eliminación de virus antes de contactar la solución de proteína con el adsorbente y, durante la etapa de adsorción, cualquier sustancia, tales como detergentes y/o disolventes orgánicos añadidos a la solución de proteína se quedan sin enlazar al adsorbente y se lava fuera de la columna antes de la elución de la proteína que se aísla.

5 En aún una modalidad de la presente invención un proceso para eliminar virus en fluidos biológicos se puede realizar por un tratamiento con disolventes orgánicos y/o detergentes; especialmente tratamiento con tri(n-butil)fosfato (TNBP) y detergentes no iónicos tales como Tween 80 o Tritón X -100. Este método puede resultar en una excelente recuperación de las proteínas lábiles, por ejemplo, el factor de coagulación VIII y IX, mientras que logra un alto nivel de destrucción de virus, por ejemplo, la destrucción de $\geq 10^6$ a $\geq 10^8$ ID, de virus envueltos; sin embargo, poca eliminación de virus no envueltos. US 4,481,189 describe la eliminación viral por un tratamiento con detergentes no aniónicos, alcoholes, éteres, o mezclas de estos. US 4,481,189 se incorporan de este modo como referencia.

10 Otros métodos de eliminación de virus comúnmente aplicados, y aplicables en la presente invención, a fluidos biológicos que se usan en un tratamiento de transfusión pueden implicar además un tratamiento con calor a temperaturas de 60 °C o más, o el tratamiento con UVC los dos solos o junto con B- propiolactona (B-PL) .

Otras modalidades

15 En la presente invención el método implica además la etapa de someter el adsorbente a un tampón de elución (un primer tampón de elución) para eluir al menos una de dichas una o más proteína (s).

20 El uso de un adsorbente acoplado con un grupo funcional (ligando) de acuerdo con la presente invención, para el aislamiento de una o más proteína (s) a partir de una solución de proteína tal como a partir de plasma o suero o de otras fuentes derivadas de sangre puede comprender las etapas de: (i) Proporcionar una solución de proteína que comprende una o más proteína de plasma o suero que tiene un pH preestablecido y una fuerza iónica preestablecida, (ii) contactar dicha solución con un adsorbente, opcionalmente se lava con uno o más tampones de equilibrio, por lo cual una o más proteínas de plasma o suero se puede (n) enlazar reversiblemente al adsorbente o permanecer sin enlazar, (iii) lavar el adsorbente con un tampón de lavado para obtener una fracción de proteína que comprende el material no enlazado, (iv) lavar el adsorbente con al menos un tampón de elución para obtener al menos un eluato que comprende proteína (s) que se enlazó reversiblemente por el adsorbente, (v) someter la proteína (s) obtenida en el tampón de lavado o la proteína (s) obtenida (s) en el tampón de elución al procesamiento corriente abajo adicional que puede incluir al menos una etapa de eliminación viral. Además, el ligando acoplado al adsorbente puede comprender un polímero de la matriz funcionalizado que porta una pluralidad de grupos funcionales unidos covalentemente que comprenden un sistema de anillo aromático o heteroaromático y uno o más grupos ácidos están cargados negativamente por encima pH 4.0.

35 Para el propósito de eliminar el material no enlazado, que incluyen la proteína (s) no enlazada(s), el adsorbente se puede someter a un tampón de lavado. En una modalidad de la presente invención una o más proteína (s) que se aísla (n) a partir de la solución de proteína se puede lavar del adsorbente con el tampón de lavado. Este lavado se puede realizar antes de someter el adsorbente a un tampón de elución como se describió anteriormente. En una modalidad de la presente invención el inhibidor de la alfa-1-proteinasa se puede lavar como una proteína no enlazada con el tampón de lavado. Las condiciones del proceso, el adsorbente y el ligando podrían ser cambiado (s) fácilmente por la persona con experiencia en la técnica de tal manera que uno o más de otra (s) proteína (s) de plasma o suero humano (otra que no sea inhibidor de la alfa-1-proteinasa) se puede lavar con el tampón de lavado y se puede enlazar el inhibidor de la alfa-1-proteinasa.

40 En una modalidad el lavado y/o la elución se puede realizar con un tampón de lavado y/o un tampón de elución que tiene un pH más alto y/o fuerza iónica más alta que el pH preestablecido y la fuerza iónica preestablecida de la solución de proteína.

45 En aún otra modalidad, el tampón de lavado y/o el tampón de elución puede comprender uno o más compuestos que tienen un grupo hidrofóbico, así como uno cargado negativamente dentro de la misma molécula por ejemplo detergente cargado negativamente tal como sulfato de octilo, azul de bromofenol, sulfonato de octano, laurilsarcosinato de sodio, sulfonato de hexano, dodecil sulfato de sodio, caprilato de sodio.

50 Para el propósito de obtener una o más proteína (s) adicional(es) a partir del adsorbente el proceso de acuerdo con la presente invención comprende además la etapa de elución con uno o más tampón (es) de elución adicional (es) para eluir la proteína (s) restante (s).

55 En el presente contexto, el término "tampón (es) de elución adicional (es) " se refiere al tampón (es) posteriormente usado(s) para la elución de una o más proteína (s), que permanece (n) unida (s) al adsorbente después de la elución con el primer tampón de elución.

En el presente contexto, el término "proteína (s) restante" se refiere a una o más proteína (s) que permanece (n) enlazada (s) al adsorbente después de ser sometida(s) a un primer tampón de elución y que la proteína (s) posteriormente se pueden eluir por la adición de un tampón de elución adicional. .

5 En una modalidad de la presente invención el adsorbente se puede lavar con un tampón de lavado adicional entre cada etapa de elución.

10 En el presente contexto, el término "fracción de proteína" se refiere a las colecciones obtenidas a partir del adsorbente en donde se puede localizar una o más proteína (s). Esta fracción de proteína se puede ser someter a procesamiento corriente abajo adicional para el aislamiento adicional de una o más proteína (s) presente (s). El procesamiento corriente abajo adicional puede implicar operaciones como la filtración, centrifugación, sedimentación, microfiltración, precipitación y cromatografía. En una modalidad de la presente invención cromatografía implica cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de fase reversa, en donde la proteína (s) se puede(n) enlazar a un segundo adsorbente en el posterior procesamiento corriente abajo.

15 En una modalidad de la presente invención el procesamiento corriente abajo puede comprender además la adsorción de la proteína en la fracción (es) de proteína(s), tal como inhibidor de la alfa-1-proteinasa, a un intercambiador iónico cargado positivamente.

20 En una modalidad de la presente invención el procesamiento corriente abajo adicional puede comprender además la adsorción de la proteína en la fracción (es) de proteína (s), tal como inhibidor de la alfa-1-proteinasa, a un alquil-amina tal como alquil-diamina, tal como diamino-hexano, diamino-heptano, diamino-octano, diamino-nonano, diamino-decano e isómeros o derivados del mismo.

25 En una modalidad de la presente invención el inhibidor de la alfa-1-proteinasa no se enlaza en la primera etapa de adsorción y el procesamiento corriente abajo adicional comprende la adsorción de la alfa-1-proteinasa a un alquil - amina tal de como una alquil-diamina, tal como diamino-hexano, diamino-heptano, diamino-octano, diamino-nonano, diamino-decano e isómeros o derivados del mismo.

30 En una modalidad de la presente invención el procesamiento corriente abajo adicional puede comprender además la adsorción de la proteína en la fracción de proteína, tal como inhibidor de la alfa-1-proteinasa, a un adsorbente en presencia de una sal liotrópica tal como, pero sin limitarse a sulfato de amonio, sulfato de potasio, sulfato de sodio, fosfato de amonio, fosfato de potasio, y citrato de sodio. En una modalidad preferida la concentración de sal liotrópica en la solución que comprende inhibidor de la alfa-1-proteinasa es al menos 0.1 M, al menos 0.25 M, tal como al menos 0.5 M, al menos 0.75 M, 35 al menos 1 M, al menos 1.25 M, al menos 1.5 M, al menos 1.75 M o al menos 2 M.

40 En aún una modalidad de la presente invención el procesamiento corriente abajo adicional comprende la adsorción de la proteína en la fracción de proteína, tal como inhibidor de la alfa-1-proteinasa, a un adsorbente en presencia o ausencia de una sal liotrópica en donde el adsorbente comprende un ligando hidrofóbico tal como un ligando no cargado que comprende, cadenas de alquilo largas opcionalmente sustituidas (por ejemplo grupos derivados de butil-, hexil-, octil-, decil-, dodecil-) y/o estructuras aromáticas y heteroaromáticas (por ejemplo grupos derivados de, fenil-, naftil-, bencimidazol). Se prefieren además ligandos tal como aquellos descritos en US 6,610,630 en donde hay descritos adsorbentes de cromatografía que utilizan ligandos mercapto-heterocíclicos, incorporados de este modo como referencia. Los ligandos preferidos adicionales son ligandos de modo mixto que comprenden una carga positiva a, y más abajo de, aproximadamente pH 4 tal como 45 ligandos cargados positivos que comprenden, cadenas de alquilo largas, opcionalmente sustituidas (por ejemplo grupos derivados de butil-, hexil-, octil-, decil-, dodecil-) y/o estructuras aromáticas y heteroaromáticas (por ejemplo grupos derivados de, fenil-, naftil-, bencimidazol). Los ejemplos no limitantes de tales ligandos son butilamina, hexilamina-, octilamina-, bencilamina y fenil-butilamina.

50 En una modalidad de la presente invención 2 o más proteínas de la solución de proteína se aíslan por medio de una cascada de 2 o más adsorbentes, tal como 3 adsorbentes, por ejemplo 4 adsorbentes, tal como 5 adsorbentes, por ejemplo 6 adsorbentes, tal como 7 adsorbentes, por ejemplo 8 adsorbentes, tal como 9 adsorbentes, por ejemplo 10 adsorbentes.

55 En una cascada de 3 adsorbentes el siguiente proceso puede ocurrir:

a) el primer adsorbente es capaz de capturar una o más proteína (s) de sangre, proteína (s) de suero o proteína (s) de plasma (s);

b) el segundo adsorbente es capaz de capturar una o más proteína (s) de sangre, proteína (s) de suero o proteína (s) de plasma diferentes de una o más proteína (s) de la sangre, proteína (s) de suero o proteína (s) de plasma capaces de ser capturadas con el primer adsorbente; y

5 c) el tercer adsorbente es capaz de capturar una o más proteína (s) de sangre, proteína (s) de suero o proteína (s) de plasma diferentes de una o más proteína de la sangre (s), proteína de suero (s) o proteína de plasma (s) capaces de ser capturadas con el primer adsorbente o segundo adsorbente;

10 En una modalidad de la presente invención uno o más factor (es) de coagulación o factor (es) anti-coagulación tal como Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor de von Willebrand, Complejo del Factor VIII -factor de von Willebrand, Factor IX, Factor X, Factor XI, inhibidor CI, proteína C y Proteína S , está/están unidos a un primer adsorbente. En una modalidad de la presente invención al menos 2 de los factores de la coagulación o anti-coagulación se une al adsorbente, tal como al menos 3 de los factores de la coagulación o anti-coagulación, por ejemplo al menos 4 de los factores de la coagulación o anti-coagulación, tal como al menos 5 de los factores de la coagulación o anti-coagulación, por ejemplo al menos 6 de los factores de coagulación o anticoagulación, tal como al menos 7 de los factores de la coagulación o anti-coagulación, por ejemplo 8 de los factores de la coagulación o anti-coagulación.

15 En otra modalidad de la presente invención al menos una de las proteínas seleccionadas de albúmina, IgG, transferrina, fibrinógeno está/están unidas a un segundo adsorbente. En una modalidad de la presente invención al menos 2 de las proteínas se unen al adsorbente, tal como al menos 3 de las proteínas, por ejemplo 4 de las proteínas.

20 En aún una modalidad de la presente invención, al menos una de las proteínas inhibidor de la α -1-proteinasa o α -1-ácido-glicoproteína se une a un tercer adsorbente. En una modalidad de la presente invención 2 de las proteínas se unen al adsorbente.

25 En una modalidad adicional de la presente invención las proteínas seleccionadas del grupo que consiste de IgG, albúmina, fibrinógeno, inhibidor de la α -1-proteinasa, α -1-ácido-glicoproteína, y uno o más factor (es) de coagulación o anti-coagulación tales como Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor de von Willebrand, Complejo de Factor VIII-factor de von Willebrand, Factor IX, Factor X, Factor XI , inhibidor CI, Proteína C y/o Proteína S , está/están aisladas en al menos 2 fracciones de proteínas individuales, tal como 3 fracciones de proteínas individuales, por ejemplo 4 fracciones de proteínas individuales, tal como 5 fracciones de proteínas individuales, por ejemplo 6 fracciones de proteínas individuales. Además, se prefiere que el grado de contaminación cruzada de la proteína individual en la fracción de proteína es a lo máximo 20%, tal como a lo máximo 15%, por ejemplo a lo máximo 10%, tal como a lo máximo 5%, por ejemplo a lo máximo 3%, tal como a lo máximo 1%, por ejemplo a lo máximo 0.5%, tal como a lo máximo 0.1%, por ejemplo a lo máximo 0.01%. Preferentemente, la fracción de proteínas individuales se obtienen dentro de un círculo de adsorción sencillo.

30 De acuerdo con la presente invención, una o más proteína (s) que se aísla(n) se puede aislar por uno de los siguientes :

40 (i) una o más proteína (s) que se aísla (n) se puede (n) lavar a través del adsorbente sin unirse específicamente al adsorbente recogido en el tampón de lavado.

(ii) una o más proteína (s) que se aísla (n) se puede(n) enlazar específicamente al adsorbente y posteriormente eluir usando uno o más tampón (es) de elución y recoger en uno o más tampón (es) de elución.

45 (iii) Una o más de la (s) proteína (s) que se aísla (n) se puede(n) lavar a través de adsorbente y otra o más proteína (s) que se aísla (n) se puede(n) enlazar específicamente al adsorbente y recoger en el tampón de lavado, y una o más de la proteína (s) de interés se puede(n) eluir posteriormente con uno o más tampón (es) de elución y recoger en uno o más tampón (es) de elución.

50 En otra modalidad de la presente invención la albúmina e IgG se pueden enlazar al adsorbente y simultáneamente el inhibidor α -1-proteinasa se puede obtener como material no enlazado a partir del adsorbente. Posteriormente, la albúmina e IgG se pueden obtener a partir del adsorbente por elución gradualmente. Preferentemente, al menos 50% de la albúmina puede enlazarse al adsorbente, tal como al menos 60%, por ejemplo al menos 70%, tal como al menos 80%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 98%. Preferentemente, al menos 50% de la IgG puede enlazarse al adsorbente, tal como al menos 60%, por ejemplo al menos 70%, tal como al menos 80%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 98%.

En el presente contexto, el término "elución gradualmente" se refiere a un cambio gradual pero discontinuo de las propiedades de un tampón de elución añadido al adsorbente en términos de, pero sin limitarse a, cambios de la fuerza iónica o conductividad, pH, polaridad, temperatura, concentración de sustancias que compiten y así sucesivamente.

5 En otra modalidad de la presente invención el fibrinógeno e IgG se pueden enlazar al adsorbente y simultáneamente se puede obtener la albúmina como material no enlazado a partir del adsorbente. Posteriormente, el fibrinógeno e IgG se pueden obtener a partir del adsorbente por elución gradualmente. Preferentemente, al menos 50% de la IgG puede enlazarse al adsorbente, tal como al menos 60%, por ejemplo al menos 70%, tal como al menos 80%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 98%. Preferentemente, al menos 50% del fibrinógeno puede enlazarse al adsorbente, tal como al menos 60%, por ejemplo al menos 70%, tal como al menos 80%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 98%.

15 En otra modalidad de la presente invención el fibrinógeno, albúmina e IgG pueden estar unidos al adsorbente y simultáneamente el inhibidor de α - 1-proteinasa se puede obtener como material no enlazado del adsorbente. Posteriormente, el fibrinógeno, albúmina e IgG se pueden obtener a partir del adsorbente por elución gradualmente. Preferentemente, al menos 50% de la IgG puede enlazarse al adsorbente, tal como al menos 60%, por ejemplo al menos 70%, tal como al menos 80%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 98%. Preferentemente, al menos 50% del fibrinógeno puede enlazarse al adsorbente, tal como al menos 60%, por ejemplo al menos 70%, tal como al menos 80%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 98%. Preferentemente, al menos 50% de la albúmina puede enlazarse al adsorbente, tal como al menos 60%, por ejemplo al menos 70%, tal como al menos 80%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 98%.

25 En otra modalidad de la presente invención al menos 1, tal como al menos 2 por ejemplo 3 de fibrinógeno, albúmina e IgG se pueden enlazar al adsorbente y simultáneamente se puede obtener α -1-ácido glicoproteína como material no enlazado a partir del adsorbente. Posteriormente, el fibrinógeno, albúmina y/o IgG se pueden obtener a partir del adsorbente por elución gradualmente. Preferentemente, al menos 50% de la IgG puede enlazarse al adsorbente, tal como al menos 60%, por ejemplo al menos 70%, tal como al menos 80%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 98%. Preferentemente, al menos 50% de fibrinógeno puede enlazarse al adsorbente, tal como al menos 60%, por ejemplo al menos 70%, tal como al menos 80%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 98%. Preferentemente, al menos 50% de la albúmina puede enlazarse al adsorbente, tal como al menos 60%, por ejemplo al menos 70%, tal como al menos 80%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 98%.

35 En otra modalidad de la presente invención al menos 1, tal como al menos 2 por ejemplo 3 de fibrinógeno, albúmina e IgG pueden enlazarse al adsorbente y simultáneamente se puede obtener α -1-ácido glicoproteína y/o inhibidor de la α -1-proteinasa como material no enlazado a partir del adsorbente. Posteriormente, fibrinógeno, albúmina y/o IgG se pueden obtener a partir del adsorbente por elución gradualmente. Preferentemente, al menos 50% de la IgG puede enlazarse al adsorbente, tal como al menos 60%, por ejemplo al menos 70%, tal como al menos 80%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 98%. Preferentemente, al menos 50% de fibrinógeno puede enlazarse al adsorbente, tal como al menos 60%, por ejemplo al menos 70%, tal como al menos 80%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 98%. Preferentemente, al menos 50% de la albúmina puede enlazarse al adsorbente, tal como al menos 60%, por ejemplo al menos 70%, tal como al menos 80%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 98%.

45 En una modalidad de la presente invención al menos 50% de inhibidor de la α -1-proteinasa, albúmina, IgG, fibrinógeno o uno o más factor (es) de la coagulación o anti-coagulación tales como Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor de von Willebrand, Complejo del Factor VIII-factor de von Willebrand, Factor IX, Factor X, Factor XI, inhibidor CI, Proteína C y/o Proteína S se pueden obtener a partir del adsorbente, tal como al menos 60%, por ejemplo al menos 70%, tal como al menos 80%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 98%.

50 En una modalidad de la presente invención la albúmina se pueden enlazar al adsorbente y simultáneamente se puede obtener el inhibidor α -1-proteinasa como material no enlazado del adsorbente. Preferentemente, al menos 50% de la albúmina puede enlazarse al adsorbente, tal como al menos 60%, por ejemplo al menos 70%, tal como al menos 80%, por ejemplo al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 98%.

55 En una modalidad de la presente invención el inhibidor α -1-proteinasa se puede aislar a partir de una solución de proteína, tal como plasma o suero, por un proceso que comprende las etapas de (i) contactar una solución acuosa de proteínas de plasma que contiene IgG, albúmina e inhibidor de la α -1-proteinasa con un adsorbente de intercambio aniónico en condiciones tales que la albúmina e inhibidor de la alfa-1-proteinasa se unen al adsorbente y la IgG permanece no enlazada

5 en donde la solución de proteína se selecciona del grupo que consiste de plasma pobre en crío pretratado, suero pobre en crío pretratado, sobrenadante I pretratado o sobrenadante II + III pretratado, sobrenadante I+II III pretratado, (ii) recuperar opcionalmente la IgG no enlazada para obtener una fracción de proteína rica en IgG; (iii) eluir la albúmina a partir del medio de intercambio aniónico para obtener una fracción rica en proteínas de albúmina, y (iv) eluir a partir del medio de intercambio aniónico para obtener una fracción de proteína rica en inhibidor de α -1-proteasa.

10 En una modalidad adicional de la presente invención la fracción de proteína no enlazada puede comprender la proteína (s), lavada a través del adsorbente, tal como inhibidor de la α -1-proteasa, α -1-ácido-glicoproteína, albúmina, IgG o fibrinógeno en alto rendimiento. Preferentemente, el rendimiento será más de 70 %, con mayor preferencia más de 80 %, con mayor preferencia más de 90 % del inhibidor de la alfa-1-proteasa.

15 Es un objeto adicional de la invención proporcionar un proceso en donde dicha proteína (s) lavada (s) a través del adsorbente, tales como inhibidor de la α -1-proteasa, α -1-ácido-glicoproteína, albúmina, IgG o fibrinógeno presentes en un rendimiento alto en la fracción de proteína no enlazada se pueden aislar posteriormente de la fracción de proteína no enlazada por procesamiento corriente abajo adicional, por ejemplo empleando una segunda etapa de adsorción cromatográfica.

20 Es una modalidad de la presente invención proporcionar un proceso en donde fracciones múltiples de proteína se proporcionan por cada ciclo de adsorción tal como al menos 2 fracciones de proteínas, por ejemplo al menos 3 fracciones de proteínas, tal como al menos 4 fracciones de proteínas, por ejemplo al menos 5 fracciones de proteínas, tal como al menos 6 fracciones de proteínas. Preferentemente cada una de estas fracciones de proteína comprende un rendimiento alto de proteínas individuales sin contaminación cruzada significativa de la fracción (es) de proteína al menos 2 proteínas, tal como al menos 3 proteínas por ejemplo al menos 4 proteínas, tal como al menos 5 proteínas por ejemplo al menos 6 proteínas dentro de la misma fracción de proteína. En una modalidad de la presente invención la cantidad de contaminación cruzada en una fracción de proteína es menos de 20 %, tal como menos de 15 %, por ejemplo menos de 10 %, tal como menos de 5 %, por ejemplo menos de 3 %, tal como menos de 1 %, por ejemplo menos de 0.5 %, tal como menos de 0.1 %, por ejemplo menos de 0.01 %.

30 En el presente contexto, el término "contaminación cruzada" se refiere a la cantidad o contenido de proteína que no es de interés que esté presente en la fracción proteica. En algunos casos, es de interés eluir dos o más proteínas simultáneamente en un círculo de elución y en este caso las proteínas eluidas intencionalmente juntas no se consideran contaminantes. En una modalidad de la presente invención el grado de contaminación cruzada de la proteína individual en la fracción de proteína es a lo máximo 20%, tal como a lo máximo 15%, por ejemplo a lo máximo 10%, tal como a lo máximo 5%, por ejemplo a lo máximo 3%, tal como a lo máximo 1%, por ejemplo a lo máximo 0.5%, tal como a lo máximo 0.1%, por ejemplo a lo máximo 0.01%.

35 La invención se ilustrará además en las siguientes figuras, puntos y ejemplos no limitantes.

40 Fig 1 ilustra el fraccionamiento gradualmente total de las proteínas de plasma humano por la adición gradual de etanol para obtener una serie de sobrenadantes y precipitados que comprenden varias proteínas de plasma humano.

45 Fig 2 ilustra la diferencia entre una columna de adsorción de lecho compactado que comprende partículas adsorbentes compactadas y una columna de adsorción de lecho expandido que comprende partículas adsorbentes, las que se fluidizan por un flujo ascendente de líquido. La columna de adsorción de lecho expandido tiene aún flujo de pistón con retromezcla mínima.

50 Fig 3 ilustra un SDS-PAGE del eluato de intercambiador iónico DEAE realizado en el Ejemplo 7 y muestra que el eluato del inhibidor de la alfa-1-proteinasa del intercambiador iónico DEAE tiene un alto grado de pureza según se estimó por SDS-PAGE (estimado en > 80%).

55 Fig 4 ilustra la actividad de unión de la elastasa en donde el carril 1 comprende la solución de proteína sin incubación de la elastasa y el carril 2 comprende la solución de proteína + incubación de la elastasa. El experimento demostró que sustancialmente todo el inhibidor de la alfa-1-proteinasa en la solución de proteína (fracción no enlazada del ejemplo 5) es activo y se une a la elastasa.

Fig 5 ilustra el resultado en el ejemplo 8 que muestra un muy alto grado de pureza del eluato de inhibidor de la alfa-1-proteinasa del Ejemplo 5 usando bencilamina como el ligando, y estimado por SDS-PAGE (pureza estimada en > 95%).
EJEMPLOS

Ejemplo 1

Separación de la albúmina humana y el inhibidor alfa-1-proteasa a partir de la fracción de Cohn (SUP I, II, III) mediante adsorción en lecho expandido.

5

Adsorbente

FastLine®UFC NNSDW Cat. núm. CS48, UpFront Cromatografía A/S. El adsorbente se basó en agarosa con partículas de carburo de tungsteno incorporadas, la densidad de las partículas del conglomerado fue de 2.9 g/ml y el diámetro de la partícula estaba en el intervalo de 40-120 µm con un diámetro medio de partícula en el volumen (D (4,3) de 70 µm (como se determinó en el Mastersizer 2000E, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). El adsorbente comprendió el ácido 2-mercaptónicootínico como ligando y tenía una concentración de ligando de 40 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

15 Pre-tratamiento de la solución de proteína

La solución de proteína constó de fracción de Cohn, sobrenadante I, II, III, conductividad 5,74 mS, pH 7.2, que comprende aproximadamente 10% etanol.

20 La solución de proteína se diluyó con agua desmineralizada en una relación de un volumen de sobrenadante de Cohn I, II, III para 2 volúmenes de agua y el pH se ajustó a pH 5.0 con ácido clorhídrico 1 M. La conductividad después de la dilución fue 3.8 mS.

Parámetros del proceso

25 El experimento se realizó en una columna FastLine® 20 en lecho expandido (Ø=2 cm) número de producto 7020-0000, UpFront Cromatografía A/S.

30 La columna se compactó con 50 cm de adsorbente (157 ml) y equilibró a temperatura ambiente (20-25 °C) con 160 ml de NaOH 1 M (primer tampón de equilibrado), 400 ml de tampón citrato sódico 40 mM pH 4.5 (segundo tampón de equilibrado), y 400 ml de tampón citrato sódico 40 mM pH 5.0 (tercer tampón de equilibrado).

Los dos experimentos se realizaron con un régimen de flujo lineal de 450 cm/h.:

35 (i) Experimento A) 236 ml de solución de proteína diluida se cargó en la columna
(ii) Experimento B) 353 ml de solución de proteína diluida se cargó en la columna tres veces

Fracción 1: el material no-enlazado se lavó de la columna con tampón de ácido cítrico 10 mM pH 5.0. El inhibidor alfa-1-proteasa se recogió en la fracción de lavado. Las proteínas enlazadas se eluyeron seguidamente en dos etapas.

- 40 - Fracción 2, primera etapa de la elución: La albúmina humana se eluyó con octanoato sódico (caprilato sódico) 5 mg/ml, pH 6.0.
- Fracción 3, segunda etapa de la elución: Otras proteínas que incluyen IgG y transferrina se eluyeron con citrato sódico 0.3 M pH 7.4.

45 RESULTADOS

La tabla más abajo muestra los volúmenes de solución de proteína y tampones cargados en cada columna:

Fracción	Corrida A	Corrida B
Primer tampón de equilibrado	160 ml	160 ml
Segundo tampón de equilibrado	400 ml	400 ml
Tercer tampón de equilibrado	400 ml	400 ml
Fracción de proteína 1 Volumen de lavado (inhibidor alfa-1-proteasa)	750 ml	815 ml

ES 2 454 566 T3

Fracción	Corrida A	Corrida B
Fracción de proteína 2 elución de albúmina humana	500 ml	520 ml
Fracción de proteína 3 elución de IgG y transferrina	350 ml	390 ml

Cuantificación del inhibidor alfa-1-proteasa y albúmina humana in Fracción 1, 2 y 3

5 La Inmunodifusión Radial Simple (SRI) se realizó para cuantificar el rendimiento relativo en por ciento de inhibidor alfa-1-proteasa y albúmina humana en las fracciones a partir de la columna como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Suppl. 10, 41-56, 1983.

10 La SRI se realizó con : anti-inhibidor alfa-1-proteasa humana en conejo de Dako Cytomation, Dinamarca, Cat. núm. : A0012 (0.6 µl por cm²) y anti albúmina humana en conejo de Dako Cytomation, Dinamarca, Cat. núm. : A001 (0.3 µl por cm²).

Una curva estándar se realizó con la solución de proteína cargada en la columna en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. Cada una de las tres fracciones se leyó con relación a la curva estándar.

15 Resultados

La tabla más abajo muestra el rendimiento relativo en por ciento de la materia prima cargada en la columna:

Determinación del inhibidor de alfa-1-proteasa humana			
Corrida	Fracción de proteína 1 de material no-enlazado	Fracción de proteína 2 de primer eluato	Fracción de proteína 3 de segundo eluato
Corrida A	80%	0%	0%
Corrida B	80%	0%	0%
Determinación de albúmina humana			
Corrida	Fracción 1 de material no-enlazado	Fracción 2 de primer eluato	Fracción 3 de segundo eluato
Corrida A	0%	95%	0%
Corrida B	0%	95%	0%

20 Cada fracción del experimento se probó con SDS-PAGE para evaluar el contenido y naturaleza de las proteínas.

SDS-PAGE

Para el SDS-PAGE, se usó el gel de Tris-Glicina Invitrogen SDS-Page 4-20% (núm. de cat. EC6025).

25 Preparación de la muestra: 25 µl de muestra y 25 µl de tampón muestra tris-glicina Invitrogen (núm. de cat. LC2676) se mezcló y calentó por 5 minutos en un baño de agua. El tampón de corrida tris 0.024 M (Sigma T1378), glicina 0.19 M (Merck 5001901000), SDS 0.1% (dodecil sulfato sódico, JT Baker 2811) pH 8.6 se añadió.

30 20 µl de muestra se aplicó en cada ranura de análisis y la potencia se ajustó para dar una corriente de 40 mA. Cuando la línea azul del tampón muestra alcanzó un cm del fondo del gel la potencia se cambió y el gel se tiñó durante la noche con el

estuche de tinción Azul coloidal de Invitrogen (núm. de cat. LC 6025) en un cuadro de agitación. El siguiente día el gel se transfirió en agua y destiñó con agua por 2 horas.

Resultados

5 Ninguna descomposición o desnaturalización de las moléculas de inhibidor alfa-1-proteasa (alfa-1-PI) humano o albúmina humana pueden detectarse mediante electroforesis en gel con dodecilsódico (SDS-PAGE). La pureza de la albúmina humana eluida se encontró que era mayor que 95% cuando se determinó mediante SDS-PAGE.

10 En la Fracción 1 se recuperó el alfa-1-PI

En la Fracción 2 se recuperó la albúmina humana enlazada.

En la Fracción 3 se recuperó la inmunoglobulina G y transferrina enlazadas.

15 EJEMPLO 2

La separación de la albúmina humana y el inhibidor alfa-1-proteasa de la fracción de Cohn (SUP I, II y III) mediante la adsorción en lecho expandido a diferentes valores de pH.

20 Adsorbente

FastLine®UFC NNSDW Cat. núm. CS48, UpFront Cromatografía A/S. Ver ejemplo 1.

25 Pre-tratamiento de la solución de proteína

La solución de proteína comprendió una fracción de Cohn del sobrenadante I, II, III, conductividad 5,74 mS, pH 7.2, que comprende aproximadamente 10% de etanol.

30 La solución de proteína se diluyó con agua desmineralizada o acetato de sodio 20 mM pH 5 en una relación de un volumen de sobrenadante de Cohn I, II, III para 5 volúmenes de agua o acetato de sodio 20 mM pH 5 y el pH se ajustó a diferentes valores de pH con ácido clorhídrico 1 M.

35 Parámetros del proceso:

El experimento se realizó en una columna FastLine®20 en lecho expandido (Ø = 2 cm) número de producto 7020-0000, UpFront Cromatografía A/S.

40 Los tres experimentos se realizaron con un régimen de flujo lineal de 450 cm/h. La columna se compactó con 50 cm de adsorbente (157 ml) y equilibró a temperatura ambiente (20-25 °C) con 160 ml de NaOH 1 M (primer tampón de equilibrado), 400 ml de tampón citrato sódico 40 mM pH 4.5 (segundo tampón de equilibrado) seguido por el equilibrado con un tercer tampón (tercer tampón de equilibrado) que comprende:

45 Experimento A: 400 ml 40 mM tampón de citrato sódico pH 5.0

Experimento B: 400 ml 40 mM tampón de citrato sódico pH 5.3

Experimento C: 400 ml 40 mM tampón de citrato sódico pH 5.5

50 240 ml de solución de proteína diluida se ajustó con HCl 1 M en:

Experimento A: pH 5.0, conductividad = 2.16 mS

Experimento B: pH 5.3, conductividad = 2.27 mS

55 Experimento C: pH 5.5, conductividad = 2.29 mS

Después de que el pH se ajustó la solución de proteína se cargó en la columna.

ES 2 454 566 T3

Fracción 1: el material no-enlazado se lavó con tampón citrato sódico 10 mM pH 5.0. El inhibidor alfa-1-proteasa se recogió en la fracción de lavado a partir de la columna.

5 Las proteínas enlazadas se eluyeron en dos etapas.

Fracción 2, primera etapa de la elución: la albúmina humana se eluyó con caprilato sódico 5 mg/ml, pH 6

10 Fracción 3, segunda etapa de la elución: otras proteínas que incluyen IgG y transferrina se eluyeron con citrato sódico 0.3 M pH 7.4.

RESULTADOS

15 La tabla más abajo muestra los volúmenes de la solución de proteína y tampones cargados en cada columna:

Fracción	Corrida A	Corrida B	Corrida C
Primer tampón de equilibrado	160 ml	160 ml	160 ml
Segundo tampón de equilibrado ⁽²⁾	400 ml	400 ml	400 ml
Tercer tampón de equilibrado	400 ml	400 ml	400 ml
Volumen de la solución de proteína	240 ml	240 ml	240 ml
Fracción de proteína 1 Volumen de la fracción de lavado (inhibidor alfa-1-proteasa)	640 ml	640 ml	685 ml
Fracción de proteína 2 Elución de albúmina humana	490 ml	430 ml	360 ml
Fracción de proteína 3 Elución de trazas humanas de IgG y transferrina	250 ml	210 ml	200 ml

Cuantificación del inhibidor alfa-1-proteasa y albúmina humana en la Fracción 1, 2 y 3

20 La Inmunodifusión Radial Simple (SRI) se realizó para cuantificar el rendimiento relativo en por ciento del inhibidor alfa-1-proteasa y albúmina humana en las fracciones a partir de la columna (ver ejemplo 1)

Resultados

25 La tabla más abajo muestra el rendimiento relativo en por ciento de la solución de proteína cargada en la columna:

Determinación del inhibidor de alfa-1-proteasa			
Corrida	Fracción de proteína 1 material no enlazado	Fracción de proteína 2 primer eluato	Fracción de proteína 3 segundo eluato
Corrida A	60%	0%	0%
Corrida B	80%	0%	0%
Corrida C	sin datos	sin datos	sin datos
Determinación de albúmina humana			

ES 2 454 566 T3

Corrida	Fracción de proteína 1 material no enlazado	Fracción de proteína 2 primer eluato	Fracción de proteína 3 segundo eluato
Corrida A	0%	95%	0%
Corrida B	20%	80%	0%
Corrida C	sin datos	sin datos	sin datos

Cada fracción del experimento se probó con SDS-PAGE para evaluar el contenido y naturaleza de las proteínas.

SDS-PAGE (Ver experimento 1)

5

Resultados

Ninguna descomposición o desnaturalización de las moléculas de inhibidor alfa-1-proteasa o albúmina pueden detectarse mediante SDS-PAGE. La pureza de la albúmina humana eluida se encontró que era mayor que 95 % cuando se determinó mediante SDS-PAGE.

10

Ejemplo 3

Aislamiento del inhibidor alfa-1-proteasa a partir de la Fracción no-enlazada obtenida en el ejemplo 1.

15

Adsorbente

FastLine®DEAE Intercambiador iónico Cat. núm. CS62, UpFront Cromatografía A/S. El adsorbente se basó en agarosa con partículas de carburo de tungsteno incorporadas, la densidad de las partículas del conglomerado fue de 2.9 g/ml y el diámetro de la partícula estaba en el intervalo de 40-120 µm con un diámetro medio de partículas de 70 µm. El adsorbente comprendió grupos dietilaminoetil (DEAE) como el ligando y una concentración de ligando de 150 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

20

Solución de proteína

25

Fracción de proteína 1 (el material no-enlazado) de la separación de la albúmina e inhibidor de la alfa-1-proteinasa como se describe en el ejemplo 1, experimento A. El pH en la fracción de proteína se ajustó a pH 8.2 con NaOH 1 M. La conductividad fue en lo sucesivo de 6.16 mS.

30

Parámetros del proceso

El experimento se realizó en columnas Poli-Prep número de producto 731-1550, BioRad.

La columna se compactó con 1ml de intercambiador iónico y equilibró a temperatura ambiente (20-25 °C) por 30 minutos con 5 ml de fosfato potásico 1 M pH 8.2. Después de la incubación el intercambiador iónico se lavó con 10 ml de fosfato potásico 10 mM pH 8.2.

35

30 ml Fracción de proteína se ajustó a pH 8.2 y cargó en la columna y las fracciones a través de la corrida se recogieron en fracciones de 5 ml. Después de cargar la fracción de proteína la columna se lavó con 10 ml fosfato potásico 10 mM pH 8.2

40

El inhibidor alfa-1-proteasa unido se eluyó con fosfato potásico 10 mM +NaCl 1 M a pH 8.2.

Resultados

45

La tabla más abajo muestra los volúmenes de materia prima y tampones cargados en la columna:

Fracción	
Fracción de proteína	30 ml

Fracción	
Volumen de las fracciones a través de la corrida	6 x 5 ml
Fracción de lavado	10 ml
inhibidor de alfa-1-proteasa, eluato	10 ml
Cuantificación del inhibidor de alfa-1-proteasa humana	

La Inmunodifusión Radial Simple (SRI) se realizó para cuantificar el rendimiento relativo en por ciento del inhibidor de alfa-1-proteasa en las fracciones a partir de la columna como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Suppl. 10, 41-56, 1983.

5 La RDI se realizó con: anti-inhibidor alfa-1-proteasa humana en conejo de Dako Cytomation, Dinamarca, Cat. núm. : A0012 (0.6 µl por cm²).

Una fila estándar se realizó con la fracción de proteína cargada en la columna en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. Cada una de las fracciones se leyó con relación a la curva estándar.

10

Resultados

La tabla más abajo muestra el rendimiento relativo del inhibidor alfa-1-proteasa en por ciento de la fracción de proteína cargada en la columna:

15

Determinación del inhibidor de alfa-1-proteasa humana

Fracción	Rendimiento Relativo
Fracción de proteína 1 a través de la corrida	0%
Fracción de proteína 2 a través de la corrida	0%
Fracción de proteína 3 a través de la corrida	0%
Fracción de proteína 4 a través de la corrida	0%
Fracción de proteína 5 a través de la corrida	0%
Fracción de proteína 6 a través de la corrida	0%
Lavado	0%
Eluato	80%

20 Así, ningún inhibidor alfa-1-proteasa se encontró en las fracciones de proteínas no-enlazadas, mientras que el 80 % del inhibidor alfa-1-proteasa cargado en la columna se encontró en el eluato.

Ejemplo 4.

25

Adsorción en lecho expandido del inhibidor de la alfa-1-proteinasa.

El Ejemplo 3 se repitió, sin embargo, esta vez usando una columna de adsorción en lecho expandido con el mismo adsorbente de intercambio iónico a una altura de lecho sedimentado de 5 cm y un régimen de flujo lineal de 5 cm/min.

30

De nuevo se encontró que ningún inhibidor alfa-1-proteasa se encontró en la fracción no-enlazada, mientras que el 80% del inhibidor alfa-1-proteasa cargado en la columna se encontró en el eluato.

Ejemplo 5

35

Aislamiento de las proteínas del plasma humano a partir del plasma humano usando la adsorción en lecho expandido con una régimen de flujo de 450 cm/h.

Adsorbente

5 FastLine ®UFC NNSDW Cat. núm. CS48, UpFront Cromatografía A/S. El adsorbente se basó en agarosa con partículas de carburo de tungsteno incorporadas, la densidad de las partículas del conglomerado fue de 2.9 g/ml y el diámetro de la partícula estaba en el intervalo de 40-120 µm con un diámetro medio de partículas de 70 µm. El adsorbente comprendió el ácido 2-mercaptónico nicotínico como el ligando y una concentración de ligando de 40 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

10 Pre-tratamiento de la solución de proteína

La solución de proteína se diluyó con agua desmineralizada en una relación de un volumen de plasma humano para 2 volúmenes de agua y el pH se ajustó a pH 5.0 con ácido clorhídrico 1 M. La conductividad fue en lo sucesivo de 5,25 mS/cm²

15 Parámetros del proceso:

El experimento se realizó en una columna FastLine®20 en lecho expandido (Ø = 2 cm) número de producto 7020-0000, UpFront Cromatografía A/S.

20 La columna se cargó con adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho sedimentado (HO) de 50 cm (que corresponde a 157 ml de adsorbente) y lavó y equilibró a 20-25 °C con los siguientes tampones en orden sucesivo % 160 ml de NaOH 1 M, ²) 400 ml de tampón de ácido cítrico 40 mM pH 4.5 ³) 400 ml de tampón de ácido cítrico 40 mM pH 5.0.

25 El experimento se realizó con un régimen de flujo lineal de 450 cm/h en todas las etapas y la salida de la columna se conectó a un monitor de UV y registrador.

Muestra:

30 120 ml solución de proteína (que corresponde a 40 ml de plasma sin diluir) se cargó en la columna.

Recolección de las fracciones:

35 A continuación de cargar la solución de proteína, el material no-enlazado y débilmente enlazado se lavó de la columna con citrato sódico 10 mM pH 5.0.

Fracción 1 (fracción no-enlazada) se recogió como una fracción de acuerdo con el control de UV del efluente de la columna.

40 A continuación las proteínas enlazadas se eluyeron en tres etapas secuenciales.

- Fracción 2 - primera etapa de la elución se realizó con caprilato sódico 5 mg/ml, pH 6.0
- Fracción 3 - segunda etapa de la elución se realizó con citrato sódico 0.3 M pH 7.4.
- 45 - Fracción 4 -tercera etapa de la elución se realizó con citrato sódico 20 mM + 0.1 M NaCl pH 7.4

Entre la primera y segunda etapa de la elución la columna se lavó brevemente con 1 volumen de columna de citrato sódico 1 M pH 7.4

50 RESULTADOS

La tabla más abajo muestra los volúmenes de cada fracción :

Fracción	Corrida
tampón de equilibrado ⁽¹⁾	160 ml
tampón de equilibrado ⁽²⁾	400 ml

ES 2 454 566 T3

Fracción	Corrida
tampón de equilibrado ⁽³⁾	400 ml
Fracción de proteína 1 proteínas no-enlazadas y lavado	900 ml
Fracción de proteína 2	550 ml
Fracción de proteína 3	560 ml
Fracción de proteína 4	370 ml

Cuantificación de la fracción de proteínas de plasma humano 1, 2, 3 y 4 a partir de la columna

5 La Inmunodifusión Radial Simple (SRI) se realizó para demostrar los componentes en cada fracción a partir de la columna como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Suppl. 10, 41-56, 1983.

La SRI se realizó con los anticuerpos siguientes, todos de Dako Cytomation, Dinamarca:

Anticuerpo.	Código núm.	µl muestra/pocillo	µl por cm ²
anti albúmina humana en conejo	A 0001	5 µl	0.30 µl por cm ²
anti IgG humana en conejo	A 0424	5 µl	0.30 µl por cm ²
anti Alfa-1-PI humana en conejo	A 0012	5 µl	0.60 µl por cm ²
anti fibrinógeno humano en conejo	A 0080	5 µl	0.40 µl por cm ²
anti haptoglobina humana en conejo	A 0030	15 µl	0.45 µl por cm ²
Anticuerpo.	Código núm.	µl muestra/pocillo	µl por cm ²
anti GC-globina humana en conejo	A 0021	15 µl	0.60 µl por cm ²
anti IgM humana en conejo	A 0426	15 µl	0.40 µl por cm ²
anti IgA humana en conejo	A 0092	15 µl	0.50µl por cm ²
anti alfa-2-macroglobulina humana en conejo	A 0033	15 µl	0.40 µl por cm ²
anti Orosomucoide humano en conejo	A 0011	5 µl	0.80 µl por cm ²
anti transferrina humana en conejo	A 0061	5 µl	0.30 µl por cm ²
anti prealbúmina humana en conejo	A 0002	15 µl	0.75 µl por cm ²
anti antitrombina III humana en conejo	A 0296	25 µl	0.50 µl por cm ²

10 Una curva estándar se estableció con la solución de proteína (100% de referencia) cargada en la columna en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. Cada una de las cuatro fracciones se determinó con relación a esta curva estándar.

Resultados

15

La tabla más abajo muestra el rendimiento relativo de cada proteína humana en las 4 fracciones de la columna:

	Fracción de proteína 1 material no enlazado	Fracción de proteína 2	Fracción de proteína 3	Fracción de proteína 4

ES 2 454 566 T3

	Fracción de proteína 1 material no enlazado	Fracción de proteína 2	Fracción de proteína 3	Fracción de proteína 4
Albúmina humana	-	100%	-	-
IgG humana	-	-	95%	5%
alfa-1-PI humano	90%	-	-	-
Fibrinógeno humano	-	-	20%	60-80%
Haptoglobina humana	40%	40%	20%	-
GC-Globulina humana	-	100%	-	-
IgM humana	-	-	80%	-
IgA humana	10%	20%	70%	-
Alfa-2 Macroglobulina humana	-	40 %	40%	-
Orosomucoid humano	100%	-		-
Transferrina humana	-	-	100%	-
Prealbúmina humana	40%	-	-	-
Antitrombina III humana	-	80%	-	-
"-" = rendimiento relativo por debajo de 5 %				

Ejemplo 6

5 Aislamiento de proteínas del plasma humano a partir de plasma humano tratado con etanol usando la adsorción en lecho expandido con una régimen de flujo de 450 cm/h.

Adsorbente

10 FastLine ®UFC NNSDW Cat. núm. CS48, UpFront Cromatografía A/S. El adsorbente se basó en agarosa con partículas de carburo de tungsteno incorporadas, la densidad de las partículas del conglomerado fue de 2.9 g/ml y el diámetro de la partícula estaba en el intervalo de 40-120 µm con un diámetro medio de partículas 70 µm. El adsorbente comprendió ácido 2-mercaptónico como el ligando y una concentración de ligando de 40 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

Pre-tratamiento de la solución de proteína

15 El plasma humano se ajustó en 8% de etanol por volumen con etanol 99% a - 3 °C e incubó a - 3 °C por 1 .5 horas. Después de la incubación el plasma se centrifugó 10 minutos. El sobrenadante se diluyó con agua desmineralizada en una relación de 1 parte de plasma con dos partes de agua y el pH se ajustó a pH 5.0 con ácido clorhídrico 1 M. La conductividad fue en lo sucesivo de 4.16 mS/cm²

Parámetros del proceso, volumen de muestra y fracciones

Todos los parámetros del proceso y condiciones fueron idénticas a aquellas aplicadas en el ejemplo 5

25 Resultados

La tabla más abajo muestra los volúmenes de cada fracción:

ES 2 454 566 T3

Fracción	Corrida
tampón de equilibrado ⁽¹⁾	160 ml
tampón de equilibrado ⁽²⁾	400 ml
tampón de equilibrado ⁽³⁾	400 ml
Fracción de proteína 1 proteínas no-enlazadas y lavado	900 ml
Fracción de proteína 2	530 ml
Fracción de proteína 3	570 ml
Fracción de proteína 4	250 ml

Cuantificación de la fracción de proteínas de plasma humano 1, 2, 3 y 4 a partir de la columna

El análisis por SRI se realizó como en el ejemplo 5.

5

Resultados

La tabla más abajo muestra el rendimiento de cada proteína humana en las 4 fracciones a partir de la columna en relación con la cantidad total de la proteína aplicada a la columna:

10

	Fracción de proteína 1 material no enlazado	Fracción de proteína 2	Fracción de proteína 3	Fracción de proteína 4
Albúmina humana	-	100%	-	-
IgG humana	-	-	95%	5%
alfa-1-PI humano	90%	-	-	-
Fibrinógeno humano	-	-	20%	60-80%
Haptoglobina humana	40%	40%	20%	-
GC-Globulina humana	-	100%	-	-
IgM humana	-	-	60%	-
IgA humana	10%	20%	60%	-
Alfa-2 Macroglobulina humana	-	50%	20%	-
Orosomucoide humano	100%	-	-	-
Transferrina humana	-	-	100%	-
Prealbúmina humana	40%	20%	-	-
Antitrombina III	-	80%	-	-

	Fracción de proteína 1 material no enlazado	Fracción de proteína 2	Fracción de proteína 3	Fracción de proteína 4
humana				
"-" = rendimiento relativo por debajo de 5 %				

EJEMPLO 7

Aislamiento del inhibidor de alfa-1-proteasa humana (API) de la fracción no-enlazada del ejemplo 5.

5

Adsorbente

FastLine ®DEAE Intercambiador iónico Cat. núm. CS62, UpFront Cromatografía A/S.

10

El intercambiador iónico se basó en 4% de agarosa con partículas de carburo de tungsteno incorporadas. Las cuentas de conglomerado tuvieron una densidad de aproximadamente 2.9 g/ml y un tamaño de partículas en el intervalo de 40-120 µm con un tamaño medio de partícula (diámetro) de 70 µm. El adsorbente comprendió grupos de DEAE (dietilaminoetil-) y una concentración de aproximadamente 150 milimoles por litro de adsorbente sedimentado

15

Solución de proteína

El material de partida para este experimento era la fracción de proteína 1 (el material no-enlazado) obtenida del aislamiento de proteínas del plasma humano usando la adsorción en lecho expandido como se describe en el ejemplo 5. El pH en la fracción de proteína se ajustó cuidadosamente a pH 8.2 con NaOH 1 M. La conductividad fue en lo sucesivo 5,15 mS/cm²

20

Parámetros del proceso:

El experimento se realizó como los experimentos en lecho compactado en columnas Poli-Prep número de producto 731-1550, BioRad, Estados Unidos.

25

Todas las etapas se realizaron a una régimen de flujo de 1 ml/minuto.

La columna se compactó con 1 ml de DEAE Intercambiador iónico y equilibró, a 20-25 °C, con 5 ml de K₂ HPO₄ 1 M ajustado a pH 8.2 con NaOH 1 M. Después de equilibrado el intercambiador iónico se lavó con 10 ml de fosfato potásico 10 mM pH 8.2.

30

50 ml de la materia prima ajustada a pH 8.2 se cargó en la columna y las fracciones a través de la corrida (el material no-enlazado) se recogieron en fracciones de 10 ml. Después de cargar la materia prima la columna se lavó con 10 ml de K₂ HPO₄ 10 mM ajustada a pH 8.2

35

A continuación de cargar y lavar el inhibidor de la alfa-1-proteinasa unido (alfa-1-PI) se liberó y eluyó con fosfato potásico 10 mM + 1 M NaCl, pH 8.2.

40

Resultados

La tabla más abajo muestra los volúmenes de materia prima y tampones cargados en la columna:

Fracción	Volumen
Fracción de proteína	50 ml
Fracciones a través de la corrida	5 x 10 ml
Fracción de lavado	10 ml
eluato del alfa-1-PI humano	10 ml

Cuantificación del alfa-1-PI humano a partir de la columna

La Inmunodifusión Radial Simple (SRI) se realizó para cuantificar la concentración relativa de alfa-1-PI en las fracciones a partir de la columna como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Suppl. 10, 41-56, 1983.

5 La SRI se realizó con anti-IFA humano en conejo de Dako Cytomation, Dinamarca, Cat. núm. : A0012 (0.6 µl por cm²).

10 Una curva estándar se realizó con la fracción de proteína (100% de referencia) cargada en la columna en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. La concentración de alfa-1-PI en cada una de las fracciones se determinó contra la curva estándar y el rendimiento relativo se calculó en esta fracción a partir del volumen de la fracción en relación con el volumen y concentración de alfa-1-PI en la fracción de proteína aplicada.

Resultados

15 La tabla más abajo muestra el rendimiento relativo en por ciento del alfa-1-PI total cargado en la columna:

Determinación del alfa-1-PI humano (inhibidor de la alfa-1-proteinasa)	
Fracción	
Fracción de proteína 1 a través de la corrida	0%
Fracción de proteína 2 a través de la corrida	0%
Fracción de proteína 3 a través de la corrida	0%
Fracción de proteína 4 a través de la corrida	5%
Fracción de proteína 5 a través de la corrida	7%
Lavado	< 5%
Eluato	85%

Pureza del eluato y demostración de la actividad de unión a la elastasa.

SDS-PAGE

20 Para SDS-PAGE, se usó gel Tris-Glicina de Invitrogen SDS-Page 4-20% (núm. de cat. EC6025).

25 La demostración de la actividad de unión a la elastasa del alfa-1-PI en la fracción de proteína (Fracción 1, ejemplo 5) se realizó analizando la fracción de proteína con SDS-PAGE antes y después de la incubación con la elastasa (Sigma núm. de código E0127): La fracción de proteína se ajustó a pH 7 con NaOH 0.2 M y 500 µl de la fracción de proteína se le añadió 6.5 µl de elastasa 2.5mg/ml e incubó por 30 min. a 30 °C.

30 Preparación de la muestra: 25 µl de muestra y 25 µl de tampón muestra tris-glicina Invitrogen (núm. de cat. LC2676) se mezcló y calentó durante 5 minutos en un baño de agua. El tampón de corrida 0.024 M tris (Sigma T1378), 0.19 M glicina (Merck 5001901000), 0.1% SDS (dodecil sulfato sódico, JT Baker 2811) pH 8.6 se añadió.

35 20 µl de muestra se aplicó en cada ranura de análisis y la potencia se ajustó para dar una corriente de 40 mA. Cuando la línea azul del tampón muestra alcanzó un cm del fondo del gel la potencia se cambió y el gel se tiñó durante la noche con el estuche de tinción azul coloidal de Invitrogen (núm. de cat. LC 6025) en un cuadro de agitación. El siguiente día el gel se transfirió en agua y destiñó con agua por 2 horas.

Resultados

40 El resultado mostró que el eluato del alfa-1-PI de la DEAE Intercambiador iónico tiene un alto grado de pureza como estimado mediante SDS-PAGE (estimado en > 80%). Ver además la fig. 3.

Además, el resultado mostró también que prácticamente todo el inhibidor de la alfa-1-proteinasa en la fracción de proteína (fracción no-enlazada del ejemplo 5) era activo y capaz de unirse a la elastasa. Ver además la fig. 4

Ejemplo 8

Aislamiento de IFA humano y orosomucoide humano (alfa-1-ácido glicoproteína) a partir de la fracción no-enlazada en el ejemplo 5.

Adsorbente

tamaño de partículas (diámetro) en el intervalo de 80-150 µm. Adsorbentes basados en 6% cuentas de agarosa reticuladas y activadas con epíclorhidrina antes del acoplamiento de los ligandos siguientes:

Experimento Núm.	Ligando
1	2 - Hidroxi - piridina (45 micromoles/ml adsorbente)
2	4 - Bencil - oxifenol (40 micromoles/ml adsorbente)
3	2 - Amino - piridina (40 micromoles/ml adsorbente)
4	1,8-Diamino - octano (50 micromoles/ml adsorbente)
5	Bencilamina (35 micromoles/ml adsorbente)
6	2,5 - dimercapto -1,3,4- tiadiazol (65 micromoles/ml adsorbente)
7	N - Octilamina (70 micromoles/ml adsorbente)

Solución de proteína

Fracción de proteína 1 (el material no-enlazado) a partir del aislamiento de las proteínas del plasma humano usando la adsorción en lecho expandido del ejemplo 5. La fracción de proteína se añadió sulfato de amonio a una concentración final de sulfato de amonio 2 M seguido por el ajuste cuidadoso del pH 8.2 con NaOH 1 M.

Parámetros del proceso

Los experimentos se realizaron como la adsorción en lecho compactado en columnas Poli-Prep número de producto 731-1550, BioRad, Estados Unidos. La régimen de flujo fue 1 ml/min en todas las etapas.

Cada una de las columnas se compactó con 1 ml de adsorbente y el adsorbente se lavó en la columna posteriormente con ¹⁾ 5 ml con agua desmineralizada y ²⁾ 4 ml de sulfato de amonio 2 M pH 8.2.

15 ml Fracción de proteína se cargó en cada columna y las fracciones a través de la corrida (el material no-enlazado) se recogieron en dos fracciones. Después de cargar la fracción de proteína las columnas se lavaron posteriormente con ¹⁾ 5 ml de sulfato de amonio 2 M pH 8.2 ²⁾ 5 ml de sulfato de amonio 1 M pH 8.2. Después del lavado el adsorbente se eluyó con 10 ml de tampón fosfato potásico 10 mM pH 8.2 + 0.1 M de NaCl (excepto para el experimento 5, donde el pH del tampón fue pH 5.0). Las fracciones del lavado y la elución se recogieron como fracciones individuales para el análisis.

RESULTADOS

La tabla más abajo muestra el volumen de la fracción de proteína cargada en las columnas así como el volumen de las fracciones recogidas durante el experimento 1-7:

Fracción de proteína aplicada	Fracción de proteína 1 a través de la corrida	Fracción de proteína 1 a través de la corrida	Lavado 1	Lavado 2	Eluato
15 ml	5 ml	10 ml	5ml	5 ml	10 ml

Cuantificación del alfa-1-PI humano y orosomucoide humano (alfa-1-ácido glicoproteína) del experimento 1 a 7

La Inmunodifusión Radial Simple (SRI) se realizó para cuantificar la concentración relativa en por ciento de las proteínas específicas en las fracciones obtenidas como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Suppl. 10, 41-56, 1983.

La SRI se realizó con los anticuerpos siguientes:

- anti-alfa-1-PI humana en conejo, Dako Cytomation, Dinamarca, Cat. núm. A0012 (0.6 µl por cm²)
- anti-orosomucoide humano en conejo, Dako Cytomation, Dinamarca, Cat. núm. A0011 (0.8 µl por cm²)

Una curva estándar se realizó con la fracción de proteína cargada en la columna (sin diluir= 100 % de referencia) en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. La concentración relativa de las proteínas específicas en las fracciones recogidas se determinó contra la curva estándar. El rendimiento relativo de las proteínas específicas en cada fracción se calculó a partir del volumen de la fracción en relación con la cantidad total de la proteína aplicada a la columna.

Determinación de la pureza del alfa-1-PI eluida (inhibidor de la alfa-1-proteínasa)

SDS-PAGE

Para el SDS-PAGE, se usó el gel Tris-Glicina de Invitrogen SDS-Page 4-20% (núm. de cat. EC6025).

Preparación de la muestra: 25µl de muestra y 25µl de tampón muestra tris-glicina Invitrogen (núm. de cat. LC2676) se mezcló y calentó durante 5 minutos en un baño de agua. El tampón de corrida 0.024 M tris (Sigma T1378), 0.19 M glicina (Merck 5001901000), 0.1% SDS (dodecil sulfato sódico, JT Baker 2811) pH 8.6 se añadió.

20 µl de muestra se aplicó en cada ranura de análisis y la potencia se ajustó para dar una corriente de 40 mA. Cuando la línea azul del tampón muestra alcanzó un cm del fondo del gel la potencia se cambió y el gel se tiñó durante la noche con el estuche de tinción azul coloidal de Invitrogen (núm. de cat. LC 6025) en un cuadro de agitación. El siguiente día el gel se transfirió en agua y destiñó con agua por 2 horas.

Resultados

La tabla más abajo muestra el rendimiento relativo de la proteína en cada fracción en por ciento de la cantidad total aplicada a la columna.

Determinación del alfa-1-PI humano y orosomucoide humano (alfa-1-ácido glicoproteína). Rendimiento en relación con la cantidad total de proteína aplicada

Experimento Núm.	Fracción 1 a través de la corrida	Fracción 2 a través de la corrida	Lavado 1	Lavado 2	Eluato
Ligando: 2 - Hidroxi - piridina					
1	alfa-1-PI	-	-	60%	40%
	Orosomucoide	20%	80%	-	-
Ligando: 4 - Bencil - oxifenol					
2	alfa-1-PI	-	-	-	30%
	Orosomucoide	-	-	-	60%
Ligando: 2 - Amino - piridina					
3	alfa-1-PI	40%	60%	-	-
	Orosomucoide	40%	60%	-	-
Ligando: 1,8 Diamino - octano					
4	alfa-1-PI	-	20%	-	20%

Ligando: 1,8 Diamino - octano						
	Orosomuroid	40%	60%	-	-	-
Ligando: Bencilamina						
5	alfa-1-PI	-	-	-	-	60%
	Orosomuroid	20%	25%	-	60%	-
Ligando: 2,5 - Dimercapto - 1,3,4- tiadiazol						
6	alfa-1-PI	-	-	-	-	90%
	Orosomuroid	15	40	-	40	-
Ligando: N - Octilamina						
7	alfa-1-PI	-	-	-	-	-
	Orosomuroid	-	-	-	-	-
"-" = rendimiento relativo por debajo de 5 %						

Procesamiento corriente abajo adicional

5

La concentración el eluato del experimento 5 (bencilamina como el ligando) mediante ultrafiltración seguido de dos etapas de inactivación viral: 1) tratamiento con disolvente-detergente y 2) filtración viral (nano-filtración) proporciona un producto adecuado para el uso terapéutico.

10 Ejemplo 9

Aislamiento de IFA humano y orosomuroid humano (alfa-1-ácido glicoproteína).

Adsorbente

15

El tamaño de partículas (diámetro) estaba en el intervalo de 80-150 µm. Los adsorbentes se basaron en 6% de cuentas de agarosa reticuladas y activadas con epíclorhidrina antes del acoplamiento de los ligandos siguientes:

Experimento Núm.	Ligando
1	2 - Hydroxi - piridina, (45 micromoles/ml adsorbente)
2	4 - Bencil - oxifenol, (40 micromoles/ml adsorbente)
3	2,5-dimercapto-1,3,4-tiadiazol, (65 micromoles/ml adsorbente)

20 Solución de proteína

Fracción de proteína 1 (el material no-enlazado) a partir del aislamiento de las proteínas del plasma humano usando la adsorción en lecho expandido del ejemplo 5. La fracción de proteína se añadió sulfato de amonio a una concentración final de sulfato de amonio 2 M seguido por el ajuste cuidadoso a pH 8.2 con NaOH 1 M.

25

Parámetros del proceso

Los experimentos se realizaron como la adsorción en lecho compactado en columnas Poli-Prep número de producto 731-1550, BioRad, Estados Unidos. La régimen de flujo fue lml/min en todas las etapas.

30

Cada una de las columnas se compactó con 1 ml de adsorbente y el adsorbente se lavó en la columna posteriormente con ¹⁾ 5 ml de agua de intercambiador iónico y ²⁾ 4 ml de sulfato de amonio 2 M pH 8.2.

5 75 ml de la fracción de proteína se cargó en cada columna y las fracciones a través de la corrida se recogieron en cinco fracciones de 15 ml cada una.

Experimento 1 y 2: Después de cargar la fracción de proteína las columnas se lavaron con 5 ml de sulfato de amonio 2 M pH 8.2 y eluyeron con 10 ml de tampón fosfato potásico 10 mM pH 8.2, 0.1 M NaCl.

10 Experimento 3: Después de cargar la fracción de proteína la columna se lavó posteriormente con ¹⁾ 5 ml de sulfato de amonio 2 M pH 8.2 ²⁾ 5 ml de sulfato de amonio 1 M pH 8.2. Después del lavado el adsorbente se eluyó con 10 ml tampón fosfato potásico 10 mM pH 8.2, 0.1 M NaCl.

15 RESULTADOS

La tabla más abajo muestra los volúmenes de la fracción de proteína y tampones cargados en las columnas en el experimento 1-3

Experimento	Fracción de proteína	Fracción de proteína 1-5 a través de la corrida	Lavado 1	Lavado 2	Eluato
1	75 ml	15 ml	5 ml	No realizado	10 ml
2	75 ml	15 ml	5 ml	No realizado	10 ml
3	75 ml	15 ml	5 ml	5 ml	10 ml

20 Cuantificación del alfa-1-PI humano y orosomucoid humano (alfa-1-ácido glicoproteína) del experimento 1 a 7

La Inmunodifusión Radial Simple (SRI) se realizó para cuantificar la concentración en por ciento de las proteínas específicas en las fracciones obtenidas a partir de la columnas en relación con la fracción de proteína como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Suppl. 10, 41-56, 1983.

25 La SRI se realizó con los anticuerpos específicos siguientes:

- anti-alfa-1-PI humana en conejo, DakoCytomation, Dinamarca, Cat. núm. A0012 (0.6 µl por cm²)
- anti-orosomucoid humano en conejo, DakoCytomation, Dinamarca, Cat. núm. A0011 (0.8 µl por cm²)

30 Una curva estándar se realizó con la fracción de proteína cargada en la columna (sin diluir = 100% de referencia) en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. La concentración relativa de las proteínas específicas en las fracciones recogidas se determinó contra la curva estándar. El rendimiento relativo de las proteínas específicas en cada fracción se calculó a partir del volumen de la fracción en relación con la cantidad total de la proteína aplicada a la columna.

35 Resultados

La tabla más abajo muestra el rendimiento relativo de alfa-1-PI y orosomucoid (alfa-1-ácido glicoproteína) en cada fracción en por ciento de la cantidad total aplicada a la columna.

Experimento - 1	Ligando: 2 hidroxipiridina	
	alfa-1-PI	Orosomucoid
Fracción de proteína 1 a través de la corrida	2%	12%
Fracción de proteína 2 a través de la corrida	4%	16%
Fracción de proteína 3 a través de la corrida	6%	16%
Fracción de proteína 4 a través de la corrida	8%	16%

ES 2 454 566 T3

Experimento - 1		Ligando: 2 hidroxipiridina	
	alfa-1-PI	Orosomucoide	
Fracción de proteína 5a través de la corrida	10%	16%	
Lavado 1	0%	16%	
Lavado 2	N.P.	N.P.	
Eluato	80%	0%	
Experimento - 2		Ligando: 4 bencil oxi-fenol	
	alfa-1-PI	Orosomucoide	
Fracción de proteína 1 a través de la corrida	0%	0%	
Fracción de proteína 2 a través de la corrida	0%	0%	
Fracción de proteína 3va través de la corrida	1%	4%	
Fracción de proteína 4 a través de la corrida	2%	6%	
Fracción de proteína 5 a través de la corrida	4%	8%	
Lavado 1	0%	0%	
Lavado 2	N.P.	N.P.	
Eluato	80%	60%	

Experimento - 3		(Mimo CS) Ligando: 2,5-Diamerapto-1,3,4-tiadiazol	
	alfa-1-PI	Orosomucoide	
Fracción de proteína 1 a través de la corrida	1%	8%	
Fracción de proteína 2 a través de la corrida	2%	12%	
Fracción de proteína 3 a través de la corrida	2%	12%	
Fracción de proteína 4 a través de la corrida	8%	16%	
Fracción de proteína 5 a través de la corrida	10%	16%	
Lavado 1	0%	0%	
Lavado 2	20%	0%	
Eluato	50%	0%	
"N.P." = No realizado			

Ejemplo comparativo 10

- 5 Aislamiento de factores de coagulación y anti-coagulación del plasma humano en bruto mediante la adsorción en lecho expandido.

Adsorbente

El adsorbente se basó en cuentas de agarosa con partículas de carburo de tungsteno incorporadas, la densidad de las partículas del conglomerado fue de 2.9 g/ml y el diámetro de la partícula estaba en el intervalo de 40-120 µm con un diámetro medio de partícula en el volumen de 70 µm. El adsorbente se activó y reticuló con epíclorhidrina y acopló con el ligando *p*-Xililenediamina (la concentración final del ligando fue de 25 micromoles por ml de adsorbente sedimentado).

5

Pre-tratamiento de la solución de proteína

El plasma humano en bruto (plasma en citrato estándar) se ajustó a pH 6.7 con ácido acético 1 M. La conductividad fue en lo sucesivo de 11.5 mS/cm²

10

Parámetros del proceso

El experimento se realizó en una columna FastLine® 10 en lecho expandido (Ø=1 cm) número de producto 7010-0000, UpFront Cromatografía A/S.

15

La columna se cargó con el adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho sedimentado (HO) de 25 cm (que corresponde a aproximadamente 20 ml de adsorbente sedimentado) y lavó y equilibró a 20-25 °C con tampón citrato sódico 20 mM pH 6.7.

20

El experimento se realizó con un régimen de flujo lineal de 300 cm/h en todas las etapas y la salida de la columna se conectó a un monitor de UV y registrador.

100 ml de solución de proteína (que corresponde a 5 veces los volúmenes de lecho sedimentado) se cargó en la columna.

25

A continuación de cargar la solución de proteína el material no-enlazado se lavó de la columna con citrato sódico 5 mM pH 6.7 (lavado etiquetado 1). Seguido del lavado 1 las proteínas débilmente enlazadas se lavaron de la columna con citrato sódico 5 mM + cloruro sódico 0.2 M pH 6.7 (lavado etiquetado 2). Posteriormente las proteínas fuertemente enlazadas se eluyeron con citrato sódico 5 mM + cloruro sódico 0.8 M pH 6.7

30

La fracción a través de la corrida y lavado 1 se recogió a partir de la columna como una fracción mientras, el lavado 2 y el eluato se recogió en una fracción separada.

35

El plasma en bruto, la fracción combinada de corrida-a través y lavado y el eluato se midieron después para la actividad de un intervalo de factores específicos de coagulación y anti-coagulación usando el analizador DiaMed CD-X (Cresser, Suiza). La actividad biológica del factor de von Willebrand (vWF) se evaluó con el ensayo del cofactor ristocetina (vWFRco). El antígeno del factor von Willebrand (vWFag) se cuantificó usando un ensayo turbidimétrico. La proteína S, proteína C e inhibidor-CI se midieron con un ensayo funcional.

40

Otras proteínas tales como albúmina, IgG, alfa-1-antitripsina, fibrinógeno, transferrina y alfa-1-ácido-glicoproteína se determinaron por Inmunodifusión Radial Simple.

Ajustando la actividad o cantidad de cualquier proteína específica aplicada a la columna en la solución de proteína en 100%, se puede determinar el rendimiento relativo en cada fracción. La recuperación total se define como la suma de los rendimientos encontrados en las fracciones de a través de la corrida, lavado y elución.

45

El eluato se analizó después mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una Superdex G200 (Amersham Biosciences). Las fracciones a partir del análisis se analizaron para la actividad del Factor VIII.

Resultados

Rendimiento y recuperación total de las proteínas seleccionadas en relación con el material de partida					
	Plasma crudo (%)	Corrida-a través/Lavado 1 (%)	Lavado 2 (%)	Eluato (%)	Recuperación (%)
Factor II	100	<5	<5	40	40-50
Factor V	100	<5	70	< 5	70-75

Rendimiento y recuperación total de las proteínas seleccionadas en relación con el material de partida					
	Plasma crudo (%)	Corrida-a través/Lavado 1 (%)	Lavado 2 (%)	Eluato (%)	Recuperación (%)
Factor VII	100	<5	<5	100	~100
Factor VIII	100	10	10	45	65
Factor IX	100	<5	10	50	60-65
Factor X	100	<5	<5	100	~100
Factor XI	100	40	10	20	70
VWFag	100	<5	<5	60	60-65
VWFRco	100	<5	<5	55	55-60
Proteína S	100	<5	<5	65	65-70
Proteína C	100	<5	<5	65	~100
inhibidor-CI	100	10	60	40	95-100
Fibrinógeno	100	95	<5	<5	98
Albúmina	100	97	1	<1	99
IgG	100	98	1	<1	99
Alfa-1-antitripsina	100	99	<1	<1	99
Alfa-1-ácido glicoproteína	100	99	<1	<1	99

La cromatografía de exclusión por tamaño en una Superdex G200 indicó que el Factor VIII en el eluato se unió con el factor von Willebrand (la actividad del Factor VIII apareció próxima al volumen muerto de la columna de exclusión por tamaño, mientras que ninguna actividad se encontró en la posición que corresponde a el Factor VIII no-enlazado).

5

Al repetir el experimento a una régimen de flujo aumentada de 500 cm/hora dio esencialmente los mismos resultados.

Ejemplo comparativo 11

10 Aislamiento del complejo Factor VIII-VWF a partir del plasma mediante la adsorción en lecho expandido. La capacidad de unión al adsorbente como una función del tamaño de partículas del adsorbente.

Adsorbentes

15 Los cuatro adsorbentes empleados en este experimento se basaron todos en cuentas de agarosa con partículas de carburo de tungsteno incorporadas, la densidad de las partículas del conglomerado fue de 2.9 g/ml mientras que el diámetro medio de las partículas en el volumen se varió entre 40 a 200 μm . Los adsorbentes se activaron y reticularon con epiclorhidrina y acoplaron con el ligando p-Xililenodiamina (la concentración final del ligando fue de 25 micromoles por ml de adsorbente sedimentado). Las preparaciones de los cuatro adsorbentes diferentes se probaron teniendo los siguientes diámetros medios de partículas en el volumen:

20 Diámetro medio de partículas en el volumen: 40 μm
 Diámetro medio de partículas en el volumen: 70 μm
 Diámetro medio de partículas en el volumen: 150 μm
 25 Diámetro medio de partículas en el volumen: 200 μm

Pre-tratamiento de la solución de proteína

El plasma humano en bruto (plasma en citrato estándar) se ajustó a pH 6.7 con ácido acético 1 M. La conductividad fue en lo sucesivo 11.5 mS/cm²

Parámetros del proceso

5 El experimento se realizó en una columna FastLine® 10 en lecho expandido (Ø=1 cm) número de producto 7010-0000, UpFront Cromatografía A/S.

10 La columna se cargó con el adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho sedimentado (HO) de 25 cm (que corresponde a aproximadamente 20 ml del adsorbente sedimentado) y lavó y equilibró a 20-25 °C con tampón citrato sódico 20 mM pH 6.7.

15 El experimento se realizó con un régimen de flujo lineal de 350 cm/h en todas las etapas y la salida de la columna se conectó a un monitor de UV y registrador.

200 ml de muestra (que corresponde a 10 veces los volúmenes de lecho sedimentado) se cargó en la columna.

15 A continuación de cargar la solución de proteína, el material no-enlazado se lavó de la columna con citrato sódico 5 mM pH 6.7 (lavado etiquetado 1). A continuación del lavado 1 las proteínas débilmente enlazadas se lavaron de la columna con citrato sódico 5 mM + cloruro sódico 0.2 M pH 6.7 (lavado etiquetado 2). Posteriormente las proteínas fuertemente enlazadas se eluyeron con citrato sódico 5 mM + cloruro sódico 0.8 M pH 6.7

20 La fracción a través de la corrida y lavado 1 se recogió a partir de la columna como una fracción mientras que, el lavado 2 y el eluato se recogió en una fracción separada.

25 El plasma en bruto, la fracción combinada de corrida-a través y lavado y el eluato se midieron después para la actividad del Factor VIII usando el analizador DiaMed CD-X (Cresser, Suiza).

30 Ajustando la actividad del Factor VIII aplicado a la columna en la solución de proteína a 100%, se determinó el rendimiento relativo en cada fracción. La recuperación total se define como la suma de los rendimientos encontrados en las fracciones a través de la corrida, lavado elución.

RESULTADOS

Rendimiento y recuperación total del Factor VIII en relación con el material de partida.

	Plasma crudo (%)	Corrida-a través/Lavado 1 (%)	Lavado 2 (%)	Eluato (%)	Recuperación (%)
Ej. A, 40 µm	100	10	10	50	70
Ej. B, 70 µm	100	20	15	35	70
Ej. C, 150 µm	100	45	20	10	85
Ej. D, 200 µm	100	70	20	5	95

35 La capacidad de unión al adsorbente del Factor VIII aumenta significativamente con una disminución en el diámetro medio de las partículas en el volumen. El experimento ilustra el desempeño superior de los adsorbentes que tienen un diámetro medio de las partículas en el volumen más abajo de 150 µm.

40 Ejemplo 12

Aislamiento de las proteínas del plasma humano a partir del plasma humano usando adsorbentes acoplados con diferentes ligandos aromáticos o hetero-aromáticos que comprenden los grupos ácidos

45 Adsorbentes

Los adsorbentes se basaron todos en agarosa con partículas de carburo de tungsteno incorporadas, la densidad de las partículas del conglomerado fue de 2.9 g/ml y el diámetro de la partícula estaba en el intervalo de 40-120 µm con un diámetro medio de las partículas en el volumen de 70 µm. Los adsorbentes se reticularon y se activaron con epíclorhidrina y

se acoplaron con los siguientes ligandos diferentes: ácido 2-mercaptocotínico, ácido 2-mercapto- benzoico, ácido 3,4-diamino-benzoico, ácido 2,4-dihidroxi-benzoico, ácido 3,5-dihidroxi-benzoico, ácido 2-(4-aminofeniltio) acético, ácido 2-mercapto-benzimidazol sulfónico, N-benzoil-cisteína.

5 La concentración de ligando en todos los adsorbentes individuales se determinó mediante la titulación ácido-base que está en el intervalo de 25 - 40 micromoles por ml del adsorbente sedimentado.

Se realizó el siguiente experimento para cada adsorbente:

10 Pre-tratamiento de la solución de proteína

La solución de proteína, plasma humano, se diluyó con agua desmineralizada en una relación de un volumen de plasma para 2 volúmenes de agua y el pH se ajustó a pH 5.0 con ácido clorhídrico 1 M. La conductividad fue en lo sucesivo 5,25 mS/cm²

15 Parámetros del proceso:

El experimento se realizó en una columna FastLine® 10 en lecho expandido (Ø=1 cm) número de producto 7010-0000, UpFront Cromatografía A/S.

20 La columna se cargó con adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho sedimentado (HO) de 50 cm (que corresponde aproximadamente a 40 ml de adsorbente sedimentado) y lavó y equilibró a 20-25 °C con los siguientes tampones en orden sucesivo ¹⁾ NaOH 1 M, ²⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 4.5 ³⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 5.0.

25 El experimento se realizó con una régimen de flujo lineal de 600 cm/h en todas las etapas y la salida de la columna se conectó a un monitor de UV y registrador.

Muestra:

30 30 ml de muestra (que corresponde a 10 ml de plasma sin diluir) se cargó en la columna.

Recolección de las fracciones:

35 A continuación de cargar la solución de proteína, el material no-enlazado y débilmente enlazado se lavó de la columna con citrato sódico 10 mM pH 5.0. La fracción de corrida-a través y lavado, RT, (fracción no-enlazada) se recogió como una fracción de acuerdo con el control de UV del efluente de la columna.

Posteriormente las proteínas enlazadas se eluyeron en tres etapas secuenciales.

- 40
- Eluato 1 - primera etapa de la elución se realizó con caprilato sódico 5 mg/ml, pH 6.0
 - Eluato 2 - segunda etapa de la elución se realizó con citrato sódico 0.3 M pH 7.4.
 - Eluato 3 -tercera etapa de la elución se realizó con citrato sódico 20 mM + 0.1 M cloruro sódico pH 7.4

45 Entre la primera y segunda etapa de la elución la columna se lavó con 1 volumen de columna de citrato sódico 1 M pH 7.4

Cuantificación de las proteínas del plasma humano en la fracción de corrida-a través/lavado y elución 1, 2, y 3: La Inmunodifusión Radial Simple (SRI) se realizó para demostrar los componentes en cada fracción a partir de la columna como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Suppl. 10, 41-56, 1983.

50 La SRI se realizó con los anticuerpos siguientes, todos de Dako Cytomation, Dinamarca:

Anticuerpo.	Código núm.	µl muestra/pocillo	µl por cm ²
anti albúmina humana en conejo	A 0001	5 µl	0.30 µl por cm ²
anti IgG humana en conejo	A 0424	5 µl	0.30 µl por cm ²
anti Alfa-1-PI humana en conejo	A 0012	5 µl	0.60 µl por cm ²

Anticuerpo.	Código núm.	µl muestra/pocillo	µl por cm ²
anti fibrinógeno humano en conejo	A 0080	5 µl	0.40 µl por cm ²
anti orosomucoid humano en conejo	A 0011	5 µl	0.80 µl por cm ²
anti transferrina humana en conejo	A 0061	5 µl	0.30 µl por cm ²

5 Una curva estándar se estableció con la solución de proteína (100% de referencia) cargada en la columna en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. Cada una de las cuatro fracciones se determinó con relación a esta curva estándar y se determinó el rendimiento relativo de la proteína específica en cada fracción. Si el rendimiento de una proteína específica en una fracción específica en relación con la cantidad de proteína añadida a la columna está por encima del 5% se define que la proteína se distribuye en dicha fracción.

Resultados

Distribución de las proteínas seleccionadas en función de la estructura del ligando						
Ligando	inhibidor de la alfa-1-proteinasa	Alfa-1-ácido glicoproteína	Albúmina	IgG	Transferrina	Fibrinógeno
ácido 2-mercapto-nicotínico	RT	RT	E1	E2	E2	E3
ácido 2-mercapto-benzoico	RT	RT	E1	E2	E2	E3
ácido 3,4-Diamino-benzoico	RT	RT	RT	E1/E2	E1/E2	E2/E3
ácido 2,4-dihidroxi-benzoico	RT	RT	RT	E2	RT	E2/E3
ácido 3,5-dihidroxi-benzoico	RT	RT	RT	E2	RT	E2/E3
ácido 2-(4-amino-feniltio)-acético	RT	RT	RT/E1	E2	E2	E2/E3
ácido 2-mercapto-benzimidazol sulfónico	RT	RT	RT/E1	E2	E2	E2/E3
N-benzoil-cisteína	RT	RT	E1/E2	E2	E2	E2/E3
RT= corrida a través y primer lavado, E1= Eluato 1, E2= Eluato 2, E3= Eluato 3						

10 Umbral: Al menos 5% de la proteína específica aplicada a la columna debe estar presente en la fracción

15 La tabla ilustra que para el ligando 2-mercapto-ácido nicotínico, sólo están presentes el inhibidor de la alfa-1-proteinasa y alfa-1-ácido glicoproteína, en un grado de más de 5% del total, en la fracción combinada de corrida-a través y lavado, mientras que la albúmina sólo está presente en el primer eluato, E1, es decir no existe cantidad significativa de albúmina presente en cualquiera de las otras fracciones, IgG y transferrina que sólo están presentes en el segundo eluato y fibrinógeno sólo presente en el tercer eluato. Así puede notarse generalmente que existe muy poca contaminación cruzada de las proteínas individuales entre las fracciones de proteína individual obtenidas en el experimento. El experimento ilustra además que un amplio intervalo de ligandos aromáticos o hetero-aromáticos que comprenden un grupo ácido se pueden usar para el fraccionamiento del plasma humano o proteínas séricas de acuerdo con la invención.

20 EJEMPLO 13

Aislamiento del inhibidor de la alfa-1-proteinasa (alfa-1-PI) humana a partir de la fracción no-enlazada del ejemplo 5 a baja fuerza iónica usando el adsorbente con un ligando diamino-nonano.

Adsorbente

5 El adsorbente se basó en 4% de agarosa con partículas de carburo de tungsteno incorporadas. Las cuentas de conglomerado tuvieron una densidad de aproximadamente 3.8 g/ml y un tamaño de partículas en el intervalo de 40-100 µm con un tamaño de partícula medio en el volumen de 60 µm. El adsorbente se reticuló y activó con epíclorhidrina y acopló con diamino-nonano. La concentración de ligando fue aproximadamente 25 µmoles por ml de adsorbente sedimentado.

Solución de proteína

10 El material de partida para este experimento era la fracción de proteína 1 (el material no-enlazado) obtenida del aislamiento de proteínas del plasma humano usando la adsorción en lecho expandido como se describe en el ejemplo 5. El pH en la fracción de proteína se ajustó cuidadosamente a pH 8.2 con hidróxido de sodio 1 M y la conductividad se ajustó a 3.0 mS/cm² con la adición de agua desmineralizada.

Parámetros del proceso

20 El experimento se realizó como una adsorción en lecho expandido.
El experimento se realizó en una columna FastLine[®] 10 en lecho expandido (Ø=1 cm) número de producto 7010-0000, UpFront Cromatografía A/S.

25 La columna se cargó con el adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho sedimentado (H0) de 20 cm (que corresponde a 16 ml de adsorbente) y se lavó y equilibró a 20-25 °C con los siguientes tampones en orden sucesivo ¹⁾ NaOH 1 M, ²⁾ HCl 0.2 M ³⁾ 50% de etanol en agua ⁴⁾ Tris/HCl 10 mM pH 8.2

30 El experimento se realizó con una régimen de flujo lineal de 900 cm/h en las etapas auxiliares y la salida de la columna se conectó a un monitor de UV y registrador.

Muestra

35 700 ml de la fracción de proteína ajustada a pH 8.2 y una conductividad de 3.0 mS/cm se cargó en la columna y las fracciones a través de la corrida (el material no-enlazado). Después de cargar la fracción de proteína, la columna se lavó con Tris/HCl 10 mM pH 8.2. La fracción de corrida-a través y el lavado se recogieron como una fracción combinada (usando el monitor-UV para seguir el lavado del material-no enlazado). A continuación de cargar y lavar el alfa-1-PI enlazado se liberó y eluyó con citrato de sodio y potasio 15 mM pH 6.0 y recogió como Eluato 1. Cuando toda el alfa-1-PI se eluyó, como monitorizado en el monitor-UV, un segundo tampón de elución, citrato sódico 15 mM +cloruro sódico 500 mM pH 5.2 se aplicaron después para liberar la alfa-1-ácido-glicoproteína como Eluato 2. El Eluato 2 se recogió de acuerdo con el pico obtenido en el registrador-UV.

Cuantificación del alfa-1-PI humano a partir de la columna

45 La Inmunodifusión Radial Simple (SRI) se realizó para cuantificar la concentración relativa de alfa-1-PI y alfa-1-ácido glicoproteína (orosomucoide) en las fracciones a partir de la columna como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Suppl. 10, 41-56, 1983.

50 La SRI se realizó con anti-API humana en conejo Cat. núm.: A0012 (0.6 µl por cm²) y anti orosomucoide humano en conejo Cat. núm. A 00110 (0.8 µl por cm²) de DakoCytomation, Dinamarca,

Una curva estándar se realizó para cada una de las dos proteínas aplicadas con la fracción de proteína como el 100% de referencia cargada en la columna en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. La concentración del alfa-1-PI y alfa-1-ácido glicoproteína en cada una de las fracciones se determinó contra la curva estándar y el rendimiento relativo en esta fracción se calculó a partir del volumen de la fracción en relación con el volumen y concentración de alfa-1-PI en la fracción de proteína aplicada.

Pureza del eluato y demostración de la actividad de unión a la elastasa.

SDS-PAGE

Para el SDS-PAGE, se usó gel Tris-Glicina de Invitrogen SDS-Page 4-20% (núm. de cat. EC6025).

5 Unión a la elastasa

10 La demostración de la actividad de unión a la elastasa del alfa-1-PI en la fracción de proteína se realizó analizando la materia prima con SDS-PAGE antes y después de la incubación con la elastasa (Sigma núm. de código E0127): La fracción de proteína se ajustó a pH 7 con NaOH 0.2 M y 500 µl de la fracción de proteína se le añadió 6.5 µl de elastasa 2.5 mg/ml e incubó durante 30 minutos a 30 °C. Preparación de la muestra: 25 µl de muestra y 25 µl de tampón muestra tris-glicina Invitrogen (núm. de cat. LC2676) se mezcló y calentó durante 5 minutos en un baño de agua. El tampón de corrida 0.024 M tris (Sigma T1378), 0.19 M glicina (Merck 5001901000), 0.1% SDS (dodecil sulfato sódico, JT Baker 2811) pH 8.6 se añadió. 20 µl de muestra se aplicó en cada ranura de análisis y la potencia se ajustó para dar una corriente 40 mA. Cuando la línea azul del tampón muestra alcanzó un cm del fondo del gel la potencia se cambió y el gel se tiñó durante la noche con el estuche de tinción azul coloidal de Invitrogen (núm. de cat. LC 6025) en un cuadro de agitación. El siguiente día el gel se transfirió al agua y destiñó con agua por 2 horas.

Resultados

20 La tabla más abajo muestra el rendimiento relativo de alfa-1-PI y alfa-1-ácido glicoproteína en por ciento de la cantidad total de las proteínas individuales cargadas en la columna:

Fracción	Alfa-1-PI (%)	Alfa-1-ácido-glicoproteína (%)
Corrida-a través/Lavado	0	0
Eluato 1	85	< 5
Eluato 2	15	85

25 Los resultados indican que el proceso de adsorción separó muy eficazmente el alfa-1-PI (inhibidor de la alfa-1-proteinasa) y la alfa-1-ácido glicoproteína.

30 El análisis por SDS-PAGE del alfa-1-PI en el Eluato 1 reveló una pureza del 80% y la actividad de unión a la elastasa se encontró que era aproximadamente 100%. La alfa-1-ácido-glicoproteína se encontró que era aproximadamente 45% pura cuando se determinó mediante SDS-PAGE.

35 Estos resultados ilustran además un aislamiento eficaz del inhibidor de la alfa-1-proteinasa y alfa-1-ácido glicoproteína usando un adsorbente que comprende un ligando amino-alquilo bajo condiciones de unión de baja fuerza iónica.

Ejemplo 14

35 Aislamiento de las proteínas del plasma humano a partir del plasma humano a diferente pH usando un adsorbente acoplado con ácido 2-mercaptónico.

Adsorbente

40 El adsorbente se basó en agarosa con partículas de carburo de tungsteno incorporadas, la densidad de las partículas del conglomerado fue de 3.6 g/ml y el diámetro de la partícula estaba en el intervalo de 40-100 µm con un diámetro medio de partículas en el volumen de 50 µm. El adsorbente se reticuló y activó con epíclorhidrina y acopló con ácido 2-mercaptónico para obtener una concentración de ligando de 32 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

Pre-tratamiento de la solución de proteína

50 La solución de proteína, plasma humano, se diluyó con agua desmineralizada en una relación de un volumen de plasma para 2 volúmenes de agua. Una serie de experimentos se realizaron en donde el material de partida se ajustó a un intervalo de diferentes valores de pH (usando ácido clorhídrico 1 M para la titulación). Los siguientes experimentos se realizaron:

- A. pH de la solución de proteína = 3.0

B. pH de la solución de proteína = 4.0

C. pH de la solución de proteína = 4.5

D. pH de la solución de proteína = 5.0

E. pH de la solución de proteína = 5.5

F. pH de la solución de proteína = 6.0

G. pH de la solución de proteína = 6.5

Parámetros del proceso

Los experimentos se realizaron en una columna FastLine[®]10 en lecho expandido (Ø=1 cm) número de producto 7010-0000, UpFront Cromatografía A/S.

Para cada experimento se cargó la columna con el adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho sedimentado (H0) de 50 cm (que corresponde a aproximadamente 40 ml de adsorbente sedimentado) y se lavó y equilibró a 20-25 °C con los siguientes tampones en orden sucesivo ¹⁾ NaOH 1 M, ²⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 4.5 ³⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM que tiene el mismo pH que la solución de proteína para el experimento específico.

El experimento se realizó con un régimen de flujo lineal de 400 cm/h en todas las etapas y la salida de la columna se conectó a un monitor de UV y registrador.

Muestra

30 ml solución de proteína (que corresponde a 10 ml de plasma sin diluir) se cargó en la columna.

Recolección de las fracciones:

A continuación de cargar la solución de proteína, el material no-enlazado y débilmente enlazado se lavó de la columna con citrato sódico 10 mM que tiene el mismo pH que la muestra para ese experimento en particular. La fracción de corrida-a través y lavado, RT, (fracción no-enlazada) se recogió como una fracción de acuerdo con el control de UV del efluente de la columna.

Posteriormente las proteínas enlazadas se eluyeron en tres etapas secuenciales.

- Eluato 1 - primera etapa de la elución se realizó con caprilato sódico 5 mg/ml, pH 6.0
- Eluato 2 - segunda etapa de la elución se realizó con citrato sódico 0.3 M pH 7.4.
- Eluato 3 -tercera etapa de la elución se realizó con citrato sódico 20 mM + cloruro sódico 0.1 M pH 7.4

Entre la primera y segunda etapa de la elución la columna se lavó con 1 volumen de columna de citrato sódico 1 M pH 7.4

Cuantificación de las proteínas del plasma humano en la fracción de corrida-a través/lavado y elución 1, 2, y 3: La Inmunodifusión Radial Simple (SRI) se realizó para demostrar los componentes en cada fracción a partir de la columna como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Suppl. 10, 41-56, 1983.

La SRI se realizó con los anticuerpos siguientes, todos de Dako Cytomation, Dinamarca:

Anticuerpo.	Código núm.	µl muestra/pocillo	µl por cm ²
anti albúmina humana en conejo	A 0001	5 µl	0.30 µl por cm ²
anti IgG humana en conejo	A 0424	5 µl	0.30 µl por cm ²
anti Alfa-1-PI humano en conejo	A 0012	5 µl	0.60 µl por cm ²

Anticuerpo.	Código núm.	µl muestra/pocillo	µl por cm ²
anti fibrinógeno humano en conejo	A 0080	5 µl	0.40 µl por cm ²
anti orosomucoid humano en conejo	A 0011	5 µl	0.80 µl por cm ²
anti transferrina humana en conejo	A 0061	5 µl	0.30 µl por cm ²

5 Una curva estándar se estableció con la solución de proteína (100% de referencia) cargada en la columna en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. Cada una de las cuatro fracciones se determinó con relación a esta curva estándar y se determinó el rendimiento relativo de la proteína específica en cada fracción de proteína. Si el rendimiento de una proteína específica en una fracción específica de proteína en relación con la cantidad de proteína añadida a la columna está por encima del 5% se define que la proteína se distribuye en dicha fracción.

Resultados

10 Distribución de las proteínas seleccionadas en función del pH de la muestra y del lavado

pH de la muestra y tampón de lavado	inhibidor de la alfa-1-proteinasa	Alfa-1-ácido glicoproteína	Albúmina	IgG	Transferrina	Fibrinógeno
A. pH = 3.0	RT/E2	ND	RT/E1/E2	RT/E2	RT/E2	RT
B. pH = 4.0	RT/E2	ND	E1/E2	RT/E1 E2/E3	E2	RT/E2/E3
C. pH = 4.5	RT/E2	RT	E1/E2	E2	E2	E3
D. pH = 5.0	RT	RT	E1	E2	E2	E3
E. pH = 5.5	RT	RT	RT/E1	E2	E2	E3
F. pH = 6.9	RT	RT	RT	RT/E2	RT/E2	E3
G. pH = 6.5	RT	RT	RT	RT/E2	RT/E2	RT/E3

RT= corrida a través y primer lavado, E1= Eluato 1, E2= Eluato 2, E3=Eluato 3, ND = no determinado. Umbral: Al menos 5% de la proteína específica aplicada a la columna debe estar presente en la fracción

15 La tabla ilustra que para el ligando ácido 2-mercaptocotínico, un valor de pH de la solución de proteína y tampón de lavado en el intervalo de pH 5.0 a pH 5.5 resulta en la separación más eficaz de las proteínas analizadas. Muchas proteínas aparecen en la fracción no-enlazada, RT, siempre que el pH sea más abajo del pH 4.5 o por encima del pH 5.5. Más abajo del pH 5.0, la alfa-1-antitripsina (inhibidor de la alfa-1-proteinasa) se encuentra que desnaturaliza (polimeriza), lo cual se soporta por el hallazgo de que aparece tanto en RT como en E2 a y más abajo del pH 4.5.

20 Ejemplo 15

Aislamiento de proteínas del plasma humano a partir del plasma humano con diferentes tampones y diferente fuerza iónica/conductividad usando un adsorbente acoplado con el ácido 2-mercaptocotínico.

25 Adsorbente

30 El adsorbente se basó en agarosa con partículas de carburo de tungsteno incorporadas, la densidad de las partículas del conglomerado era de 3.6 g/ml y el diámetro de la partícula estaba en el intervalo de 40-100 µm con un diámetro medio de partículas en el volumen de 50 µm. El adsorbente se reticuló y activó con epíclorhidrina y acopló con ácido 2-mercaptocotínico para obtener una concentración de ligando de 32 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

Pre-tratamiento de la solución de proteína

La solución de proteína, plasma humano, se diluyó con agua desmineralizada en una relación de un volumen de plasma para 2 volúmenes de agua. Una serie de experimentos se realizaron en donde la solución de proteína se le añadió un intervalo de diferentes sustancias tampones que resultan en un intervalo de diferentes fuerzas iónicas/conductividades. Todos los experimentos se realizaron en una muestra de pH de 5.0

Se realizaron los siguientes experimentos:

A. citrato sódico 10 mM, conductividad = 6,0 mS/cm

B. 20 mM citrato sódico, conductividad = 8,5 mS/cm

C. 20 mM citrato sódico, conductividad = 6,2 mS/cm

D. 20 mM histidina, conductividad = 6,6 mS/cm

E. 20 mM glicina, conductividad = 5,5 mS/cm

F. 20 mM octilamina, conductividad = 8,0 mS/cm

Parámetros del proceso:

Los experimentos se realizaron en una columna FastLine®10 en lecho expandido ($\varnothing=1$ cm) número de producto 7010-0000, UpFront Cromatografía A/S.

Para cada experimento se cargó la columna con el adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho sedimentado (H0) de 50 cm (que corresponde a aproximadamente 40 ml de adsorbente sedimentado) y lavó y equilibró at 20-25 °C con los siguientes tampones en orden sucesivo ¹⁾ NaOH 1 M, ²⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 4.5 ³⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 5.0.

El experimento se realizó con una régimen de flujo lineal de 400 cm/h en todas las etapas y la salida de la columna se conectó a un monitor de UV y registrador.

Muestra

30 ml solución de proteína (que corresponde a 10 ml de plasma sin diluir) se cargó en la columna.

Recolección de la fracción de proteínas:

A continuación de cargar la solución de proteína, el material no-enlazado y débilmente enlazado se lavó de la columna con el mismo tipo de tampón y la misma concentración de tampón que la añadida a la muestra para el experimento en particular. Todos los tampones fueron a pH 5.0. La fracción de corrida-a través y lavado, RT, (fracción no-enlazada) se recogió como una fracción de acuerdo con el control de UV del efluente de la columna.

Posteriormente las proteínas enlazadas se eluyeron en tres etapas secuenciales.

- Eluato 1 - primera etapa de la elución se realizó con caprilato sódico 5 mg/ml, pH 6.0
- Eluato 2 - segunda etapa de la elución se realizó con citrato sódico 0.3 M pH 7.4.
- Eluato 3 -tercera etapa de la elución se realizó con citrato sódico 20 mM + cloruro sódico 0.1 M pH 7.4

Entre la primera y segunda etapa de la elución la columna se lavó con 1 volumen de columna de citrato sódico 1 M pH 7.4

Cuantificación de las proteínas del plasma humano en la fracción de corrida-a través/lavado y elución 1, 2, y 3: La Inmunodifusión Radial Simple (SRI) se realizó para demostrar los componentes en cada fracción a partir de la columna como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Suppl. 10, 41-56, 1983.

La SRI se realizó con los anticuerpos siguientes, todos de Dako Cytomation, Dinamarca:

Anticuerpo.	Código núm.	µl muestra/pocillo	µl por cm ²
anti albúmina humana en conejo	A 0001	5 µl	0.30 µl por cm ²
anti IgG humana en conejo	A 0424	5 µl	0.30 µl por cm ²
anti Alfa-1-PI humano en conejo	A 0012	5 µl	0.60 µl por cm ²
anti fibrinógeno humano en conejo	A 0080	5 µl	0.40 µl por cm ²
anti orosomucoide humano en conejo	A 0011	5 µl	0.80 µl por cm ²
anti transferrina humana en conejo	A 0061	5 µl	0.30 µl por cm ²

5 Una curva estándar se estableció con la solución de proteína (100% de referencia) cargada en la columna en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. Cada una de las cuatro fracciones de proteínas se determinó con relación a esta curva estándar y se determinó el rendimiento relativo de la proteína específica en cada fracción de proteína. Si el rendimiento de una proteína específica en una fracción específica de proteína en relación con la cantidad de proteína añadida a la columna está por encima del 5 % se define que la proteína se distribuye en dicha fracción de proteína.
RESULTADOS

10 Distribución de las proteínas seleccionadas en función de la composición/conductividad de la muestra y tampón de lavado .

Tampón añadido a la muestra y tampón de lavado	inhibidor de la alfa-1-proteinasa	Alfa-1-ácido glicoproteína	Albúmina	IgG	Transferrina	Fibrinógeno
a. citrato sódico 10 mM;	RT	RT	E 1	E2	E2	E3
b. 20 mM citrato sódico	RT	RT	RT/E1	E2	E2	E3
c. 20 mM acetato sódico	RT	RT	E1	E2	E2	E3
d. 20 mM histidina	RT	RT	E1	E2	E2	E3
e. 20 mM glicina	RT	RT	E1	E2	E2	E3
f. 20 mM octilamina	RT	RT	RT	RT	RT	RT/E3

RT= corrida a través y primer lavado, E1= Eluato 1, E2= Eluato 2, E3=Eluato 3. Umbral: Al menos 5 % de la proteína específica aplicada a la columna debe estar presente en la fracción.

Ejemplo 16

15 Aislamiento de proteínas del plasma humano y animal a partir de diferentes plasmas humano y animal sin diluir usando un adsorbente acoplado con ácido 2-mercaptónico.

Adsorbente

20 El adsorbente se basó en agarosa con partículas de carburo de tungsteno incorporadas, la densidad de las partículas del conglomerado era de 2.0 g/ml y el diámetro de la partícula estaba en el intervalo de 50-150 µm con un diámetro medio de partículas en el volumen de 120 µm. El adsorbente se reticuló y activó con epíclorhidrina y acopló con ácido 2-mercaptónico para obtener una concentración de ligando de 36 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

25 Pre-tratamiento de la solución de proteína

La solución de proteína, plasma a partir de humano y un intervalo de plasma animal diferente, se ajustó a pH 5.0 con ácido clorhídrico 1 M. Una serie de experimentos se realizaron usando diferentes plasmas:

Se realizaron los siguientes experimentos:

- 5
- A. Plasma humano sin diluir
 - B. Plasma de caballo sin diluir
 - 10 C. Plasma bovino sin diluir
 - D. Plasma de conejo sin diluir
 - E. Plasma de cabra sin diluir
 - 15 F. Plasma de pollo sin diluir
 - G. Plasma de cerdo sin diluir
 - 20 H. Plasma de ratón sin diluir

Parámetros del proceso

25 Los experimentos se realizaron en una columna FastLine[®]10 en lecho expandido (Ø=1 cm) número de producto 7010-0000, UpFront Cromatografía A/S.

30 Para cada experimento se cargó la columna con el adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho sedimentado (H0) de 50 cm (que corresponde aproximadamente a 40 ml de adsorbente sedimentado) y lavó y equilibró at 20-25 °C con los siguientes tampones en orden sucesivo ¹⁾ NaOH 1 M; ²⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 4.5 ³⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 5.0.

El experimento se realizó con una régimen de flujo lineal de 900 cm/h en todas las etapas y la salida de la columna se conectó a un monitor de UV y registrador.

35 Muestra

20 ml solución de proteína se cargó en la columna (que corresponde a 0.5 ml de plasma por ml de adsorbente sedimentado).

40 Recolección de la fracción de proteínas:

A continuación de cargar la solución de proteína, el material no-enlazado y débilmente enlazado se lavó de la columna con citrato sódico 10 mM pH 5.0. La fracción de corrida-a través y lavado, RT, (fracción no-enlazada de proteína) se recogió como una fracción de proteína de acuerdo con el control de UV del efluente de la columna.

45 Posteriormente las proteínas enlazadas se eluyeron en tres etapas secuenciales.

- Eluato 1 - primera etapa de la elución se realizó con caprilato sódico 5 mg/ml, pH 6.0
- Eluato 2 - segunda etapa de la elución se realizó con citrato sódico 20 mM + cloruro sódico 0.1 M pH 7.4

50 Todas las fracciones de proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE no-reducido usando gel Tris-Glicina de Invitrogen SDS-Page 4-20% (núm. de cat. EC6025). Las bandas teñidas con coomassie en el SDS PAGE se examinaron cualitativamente y semi-cuantitativamente mediante la inspección visual para registrar la distribución de las proteínas de plasma seleccionadas en las fracciones individuales de la columna. Si una banda de proteína, presente en una fracción específica de proteína, se estima que representa más del 10% del total de proteína añadida a la columna se define que la proteína se distribuye en esa fracción de proteína en particular (el valor umbral).

Resultados

Distribución de las proteínas seleccionadas en función del origen de la muestra.		
Muestra	Albúmina	IgG
A. Plasma Humano	RT/E1	E2
B. Plasma de caballo	RT/E1	E2
C. Plasma de Vaca	RT/E1	E2
D. Plasma de Conejo	RT/E1	E2
E. Plasma de Cabra	RT/E1	E2
F. Plasma de Pollo	RT/E1	E2
G. Plasma de Cerdo	RT/E1	E2
H. Plasma de Ratón	RT/E1	E2

RT= corrida a través y primer lavado, E1= Eluato 1, E2= Eluato 2. Umbral: Al menos 10 % de la proteína específica aplicada a la columna debe estar presente en la fracción.

5 Los resultados ilustran que diferentes plasmas humanos y animal sin diluir se comportan de manera muy similar cuando se fraccionan con un ácido 2-mercapto-nicotínico acoplado al adsorbente bajo condiciones de proceso especificadas. El adsorbente enlaza y eluye prácticamente toda la IgG de todas las especies probadas. El adsorbente enlaza la mayoría de la albúmina presente en todas las muestras de plasma probadas y en todos los experimentos la albúmina enlazada se eluye eficazmente con el tampón de 5 mg/ml caprilato sódico pH 6.0.

10 Ejemplo 17

Aislamiento de las proteínas de plasma humano a partir de plasma humano usando adsorbentes de diferentes tamaños, acoplado con ácido 2-mercaptónico.

15 Adsorbente

Los adsorbentes empleados se basaron todos en agarosa con partículas de carburo de tungsteno incorporadas, la densidad de las partículas del conglomerado era de 2.5 g/ml y el diámetro de la partícula y el diámetro medio de partículas en el volumen varió como sigue:

20 Adsorbente A.

Intervalo de diámetro de partícula: 60-140 µm
Diámetro medio de partículas en el volumen : 90 µm

25 Adsorbente B.

Intervalo de diámetro de partícula: 60-150 µm
Diámetro medio de partículas en el volumen : 120 µm

30 Adsorbente C.

Intervalo de diámetro de partícula: 80-240 µm
Diámetro medio de partículas en el volumen : 150 µm

35 Adsorbente D.

Intervalo de diámetro de partícula: 80-300 µm
Diámetro medio de partículas en el volumen : 200 µm

Adsorbente E.

Intervalo de diámetro de partícula: 100 - 400 µm
Diámetro medio de partículas en el volumen: 250 µm

Los adsorbentes A-E se produjeron por tamizado en redes de nailon de tamaño de poro definido a partir de un lote de partículas que tienen una distribución de tamaño amplio, que se reticuló primero y activó con epiclorhidrina y acopló con ácido 2-mercaptotricloroacético para obtener una concentración de ligando de 28 micromoles por ml de adsorbente sedimentado. Así, todos los adsorbentes A-E se diseñaron para desviarse uno del otro sólo con respecto al tamaño de las partículas.

Para cada adsorbente A-E se realizó el siguiente experimento:

Pre-tratamiento de la solución de proteína

La solución de proteína, plasma humano, se diluyó con agua desmineralizada en una relación de un volumen de plasma para 2 volúmenes de agua y el pH se ajustó a pH 5.0 con ácido clorhídrico 1 M. La conductividad fue en lo sucesivo de 5,2 mS/cm²

Parámetros del proceso

El experimento se realizó en una columna FastLine[®]10 en lecho expandido (Ø= 1 cm) número de producto 7010-0000, UpFront Cromatografía A/S.

La columna se cargó con adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho sedimentado (H0) de 50 cm (que corresponde aproximadamente a 40 ml de adsorbente sedimentado) y se lavó y equilibró a 20-25 °C con los siguientes tampones en orden sucesivo ¹⁾ NaOH 1 M, ²⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 4.5 ³⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 5.0.

El experimento se realizó con un régimen de flujo lineal de 900 cm/h en todas las etapas y la salida de la columna se conectó a un monitor de UV y registrador.

Muestra

30 ml de muestra (que corresponde a 10 ml de plasma sin diluir) se cargó en la columna.

Recolección de la fracción de proteínas:

A continuación de cargar la muestra de proteína, el material no-enlazado y débilmente enlazado se lavó de la columna con citrato sódico 10 mM pH 5.0. La fracción de corrida-a través y lavado, RT, (fracción no-enlazada) se recogió como una fracción de proteína de acuerdo con el control de UV del efluente de la columna.

Posteriormente las proteínas enlazadas se eluyeron en tres etapas secuenciales.

- Eluato 1 - primera etapa de la elución se realizó con caprilato sódico 5 mg/ml, pH 6.0
- Eluato 2 - segunda etapa de la elución se realizó con citrato sódico 20 mM + 0.1 M cloruro sódico pH 7.4

Cuantificación de proteínas del plasma humano en la fracción de corrida-a través/lavado y elución 1 y 2, la Inmunodifusión Radial Simple (SRI) se realizó para demostrar los componentes en cada fracción de proteína a partir de la columna como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Suppl. 10, 41-56, 1983.

La SRI se realizó con los anticuerpos siguientes, todos de Dako Cytomation, Dinamarca:

Anticuerpo.	Código núm.	µl muestra/pocillo	µl por cm ²
anti albúmina humana en conejo	A 0001	5 µl	0.30 µl por cm ²
anti IgG humana en conejo	A 0424	5 µl	0.30 µl por cm ²

Una curva estándar se estableció con la solución de proteína (100% de referencia) cargada en la columna en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. Cada una de las tres fracciones de proteínas se determinó con relación a esta curva estándar y el rendimiento relativo de la proteína específica en cada fracción de proteína se determinó.

Resultados

Distribución de las proteínas seleccionadas en función del tamaño de partícula del adsorbente

Intervalo del tamaño de partícula del adsorbente y tamaño medio de las partículas en el volumen	Albúmina (%)	IgG (%)
Adsorbente A.	RT: < 5	RT: < 5
Intervalo de diámetro de partícula: 60-140 µm	E1: 90	E1: < 5
Diámetro medio de partículas en el volumen : 90 µm	E2: < 5	E2: 90
Adsorbente B.	RT: < 5	RT: < 5
Intervalo de diámetro de partículas: 60-150 µm	E1: 90	E1: < 5
Diámetro medio de partículas en el volumen : 120 µm	E2: < 5	E2: 90
Adsorbente C.	RT: 10	RT: 20
Intervalo de diámetro de partículas: 80-240 µm	E1: 88	E1: < 5
Diámetro medio de partículas en el volumen : 150 µm	E2: < 5	E2: 70
Adsorbente D.	RT: 25	RT: 30
Intervalo de diámetro de partícula: 80-300 µm	E1: 70	E1: < 5
Diámetro medio de partículas en el volumen : 200 µm	E2: < 5	E2: 50
Adsorbente E.	RT: 30	RT: 30
Intervalo de diámetro de partículas: 100 - 400 µm	E1: 65	E1: < 5
Diámetro medio de partículas en el volumen: 250 µm	E2: < 5	E2: 50
RT= corrida a través y primer lavado, E1= Eluato 1, E2= Eluato 2		

- 5 Los resultados ilustran que a un régimen de flujo alto (900 cm/hora) sólo los adsorbentes que tienen un tamaño medio de partícula en volumen por debajo de 150 µm alcanzan unir prácticamente toda la albúmina e IgG presente en la muestra aplicada. Cuanto mayor sea el tamaño de partícula menor es el rendimiento de la proteína en las fracciones de proteínas del eluato respectivo.
- 10 Ejemplo 18
- Aislamiento a gran escala de las proteínas del plasma humano a partir del plasma humano en una columna EBA de 30 cm de diámetro.
- 15 Adsorbente
- El adsorbente se basó en agarosa con partículas de carburo de tungsteno incorporadas, la densidad de las partículas del conglomerado era de 2.8 g/ml y el diámetro de la partícula está en el intervalo de 40-120 µm con un diámetro medio de partículas de 72 µm. El adsorbente comprendió ácido 2-mercaptocotínico como el ligando y tuvo una concentración de ligando de 38 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.
- 20 Pre-tratamiento de la solución de proteína
- 25 La solución de proteína, plasma humano en citrato, se diluyó con agua desmineralizada en una relación de un volumen de plasma para 2 volúmenes de agua y pH se ajustó a pH 5.0 con ácido clorhídrico 1 M. La conductividad fue en lo sucesivo de 5,3 mS/cm²
- Parámetros del proceso

ES 2 454 566 T3

El experimento se realizó en una columna FastLine[®]300 en lecho expandido (Ø=30 cm), número de producto 7300-0000, UpFront Cromatografía A/S.

5 La columna se cargó con adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho sedimentado (HO) de 50 cm (que corresponde a 35.3 L de adsorbente) y se lavó y equilibró a 20-25 °C con los siguientes tampones en orden sucesivo ¹⁾ 36 L NaOH 1 M, ²⁾ 90 L tampón de ácido cítrico 40 mM pH 4.5 ³⁾ 90 L tampón de ácido cítrico 40 mM pH 5.0.

10 El experimento se realizó con una régimen de flujo lineal de 450 cm/h (que corresponde a un flujo volumétrico de 5,3 L/min) en todas las etapas y la salida de la columna se conectó a un monitor de UV y registrador.

Muestra

39 L de la solución de proteína (que corresponde a 13 L plasma sin diluir) se cargó en la columna.

15 Recolección de la fracción de proteínas:

A continuación de cargar la solución de proteína, el material no-enlazado y débilmente enlazado se lavó de la columna con citrato sódico 10 mM pH 5.0. La Fracción 1 (fracción no-enlazada) se recogió como una fracción de proteína de acuerdo con el control de UV del efluente de la columna.

20 Posteriormente las proteínas enlazadas se eluyeron en tres etapas secuenciales.

- Fracción de proteína 2 - primera etapa de la elución se realizó con caprilato sódico 5 mg/ml, pH 6.0
- Fracción de proteína 3 - segunda etapa de la elución se realizó con citrato sódico 0.3 M pH 7.4.
- 25 - Fracción de proteína 4 -tercera etapa de la elución se realizó con citrato sódico 20 mM + 0.1 M NaCl pH 7.4

Entre la primera y segunda etapa de la elución la columna se lavó brevemente con 40 L de 1 M citrato sódico pH 7.4

30 Resultados

La tabla más abajo muestra los volúmenes de cada fracción:

Fracción	Corrida
tampón de equilibrado ⁽¹⁾	36 l
tampón de equilibrado ⁽²⁾	90 l
tampón de equilibrado ⁽³⁾	90 l
Fracción de proteína 1 proteínas no-enlazadas y lavado	293 l
Fracción de proteína 2	136 l
Fracción de proteína 3	135 l
Fracción de proteína 4	83 l

35 Cuantificación de la fracción de proteínas de plasma humano 1, 2, 3 y 4 a partir de la columna

La Inmunodifusión Radial Simple (SRI) se realizó para demostrar los componentes en cada fracción de proteína a partir de la columna como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Suppl. 10, 41-56, 1983.

ES 2 454 566 T3

La SRI se realizó con los anticuerpos siguientes, todos de Dako Cytomation, Dinamarca:

Anticuerpo.	Código núm.	µl muestra/pocillo	µl por cm ²
anti albúmina humana en conejo	A 0001	5 µl	0.30 µl por cm ²
anti IgG humana en conejo	A 0424	5 µl	0.30 µl por cm ²
anti Alfa-1-PI humano en conejo	A 0012	5 µl	0.60 µl por cm ²
anti fibrinógeno humano en conejo	A 0080	5 µl	0.40 µl por cm ²
anti haptoglobina humana en conejo	A 0030	15 µl	0.45 µl por cm ²
anti GC-globina humana en conejo	A 0021	15 µl	0.60 µl por cm ²
anti IgM humana en conejo	A 0426	15 µl	0.40 µl por cm ²
anti IgA humana en conejo	A 0092	15 µl	0.50µl por cm ²
anti alfa-2-macroglobulina humana en conejo	A 0033	15 µl	0.40 µl por cm ²
anti orosomucoid humano en conejo	A 0011	5 µl	0.80 µl por cm ²
anti transferrina humana en conejo	A 0061	5 µl	0.30 µl por cm ²
anti prealbúmina humana en conejo	A 0002	15 µl	0.75 µl por cm ²
anti antitrombina III humana en conejo	A 0296	25 µl	0.50 µl por cm ²

- 5 Una curva estándar se estableció con la solución de proteína (100% de referencia) cargada en la columna en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. Cada una de las cuatro fracciones de proteínas se determinó con relación a esta curva estándar para cada proteína probada y se determinó el rendimiento relativo de la proteína específica en cada fracción de proteína.

Resultados

10

El rendimiento de cada proteína humana en relación con la materia prima aplicada en cada una de las 4 fracciones a partir de la columna EBA:

	Fracción 1 material no enlazado	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4
Albúmina humana	-	98%	-	-
IgG humana	-	-	95%	5%
alfa-1-PI humano	95%	-	-	-
Fibrinógeno humano	-	-	10%	60-80%
Haptoglobina humana	40%	40%	20%	-
GC-Globulina humana	-	100%	-	-
IgM humana	-	-	75%	-
IgA humana	15%	20%	70%	-
Alfa-2 Macroglobulina humana	-	45%	35%	-
Orosomucoid humano	100%	-	-	-
Transferrina humana	-	-	95%	-
Prealbúmina humana	55%	-	-	-

	Fracción 1 material no enlazado	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4
Antitrombina III humana	-	75%	-	-
"-" = rendimiento relativo por debajo de 5 %				

El proceso de acuerdo con la invención se trabajó de manera eficiente en gran escala y resultó una separación de las proteínas plasmáticas muy similares a los experimentos realizados en columnas de 1 cm de diámetro.

5 Ejemplo 19

Aislamiento de proteínas del plasma humano a partir del plasma pobre en crío usando la adsorción en lecho expandido con una régimen de flujo de 450 cm/h y condiciones como en el Ejemplo 5.

10 El plasma pobre en crío, denominado además criosobrenadante, producido por el descongelamiento lento del plasma humano en citrato congelado y la separación del crío-precipitado se usó en lugar del plasma humano en citrato completo en una repetición del ejemplo 5. Todos los parámetros se mantuvieron constantes.

15 Resultados

El experimento dio un resultado similar a los resultados obtenidos con plasma humano completo como se describe en el ejemplo 5 excepto por la ausencia sustancialmente completa de fibrinógeno en la fracción de proteína 4 (eluato 3).

20 Ejemplo 20

Aislamiento de fibrinógeno a partir del crioprecipitado resolubilizado. Adsorción en lote usando adsorbente de alta densidad que tiene bajo diámetro medio en volumen.

25 Adsorbente

El adsorbente se basó en agarosa con partículas de carburo de tungsteno incorporadas, la densidad de las partículas del conglomerado era de 3.8 g/ml y el diámetro de la partícula estaba en el intervalo de 20-60 µm con un diámetro medio de partículas de 38 µm. El adsorbente comprendió el ácido 2-mercaptónicootínico como el ligando y una concentración de ligando de 31 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

30 Pre-tratamiento de la solución de proteína

El crioprecipitado producido por el descongelamiento lento de 2000 ml de plasma humano en citrato congelado y separado a partir del crío-sobrenadante se re-solubilizó mezclando con citrato sódico 10 mM pH 6.7 que resulta en aproximadamente 120 ml de solución turbia.

35 Adsorción en lote seguida de la elución por columna

40 El crío-precipitado resolubilizado se transfirió a un vaso de vidrio de 200 ml y se añadieron 20 ml de cuentas de adsorbente lavadas exhaustivamente con citrato sódico 10 mM pH 6.7. El mezclado del adsorbente y la solución de proteína se realizó con un agitador mecánico suave durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la adsorción del adsorbente se dejó sedimentar y el sobrenadante se decantó. El tampón de lavado (citrato de sodio 20 mM pH 6,7) se añadió después 3 veces como alícuotas de 100 ml con mezclado, sedimentación y decantación entre cada adición. El mezclado se realizó durante 2 minutos para cada adición. Después del lavado, el adsorbente se suspendió en una pequeña cantidad de tampón de lavado y se vertió en una columna de lecho compactado de 2 cm de diámetro, en donde se sedimentó muy rápidamente. La elución de la proteína enlazada se realizó después mediante la adición de fosfato de potasio 20 mM + cloruro de sodio 0.8 M pH 6,7 a un régimen de flujo de 2 ml por minuto. La elución de la columna se monitorizó con un monitor UV y el pico de elución se recogió en una fracción.

50 La fracción de proteína del eluato se analizó para la pureza usando SDS-PAGE (gel de Tris-glicina no-reducido Invitrogen SDS-PAGE 4-20%, núm. de cat. : EC6025). La actividad funcional de fibrinógeno se determinó por el método de von Clauss (tiempo de coagulación con trombina bovina).

Resultados

Al detener la mezcla del adsorbente y el crioprecipitado de re-solubilizado después de los 30 minutos del período de adsorción las partículas del adsorbente sedimentaron en el fondo del recipiente en menos de 30 segundos. La decantación de los sobrenadantes a partir del adsorbente sedimentado fue extremadamente fácil ya que las cuentas del adsorbente permanecieron en el fondo del vaso de vidrio sin ninguna tendencia significativa a mezclarse con la fase líquida. La adición y el lavado con tampón de lavado 3x se realizó igualmente dentro de pocos minutos, debido a la rápida separación del adsorbente. El adsorbente se compactó a partes iguales en la columna de elución en menos de un minuto (estos procedimientos normalmente toman hasta varias horas con las cuentas de baja densidad de un diámetro tan pequeño). El fibrinógeno se eluye de la columna como una solución clara altamente concentrada de fibrinógeno (volumen de elución = 21 ml).

El análisis por SDS-PAGE del fibrinógeno eluido reveló que la proteína fue más del 85% pura con la IgG siendo el principal contaminante. Ninguna albúmina pudo detectarse en el eluato. La actividad biológica del fibrinógeno eluido se encontró que era completamente intacta.

El experimento ilustra la ventaja significativa de usar un adsorbente de alta densidad que tiene bajo diámetro medio en volumen para la separación de las proteínas plasmáticas del crioprecipitado re-solubilizado.

Ejemplo 21

Aislamiento de la cascada de factores de la coagulación/anti-coagulación, albúmina, IgG, fibrinógeno, inhibidor de la alfa-1-proteinasa y alfa-1-ácido glicoproteína usando tres columnas consecutivas y plasma humano con virus eliminado como la solución de proteína.

Adsorbentes

Los adsorbentes usados en el ejemplo 10 (Ligando = 1,4-diamino-xilileno), ejemplo 5 (ácido 2-mercapto-nicotínico) y el ejemplo 13 (1,9-diamino-nonano) se utilizó en este experimento.

Eliminación el Virus

Una solución de proteína de plasma humano se trató con una solución de disolvente-detergente (conocida como tratamiento S/D) con la adición de fosfato de tri-n-butilo (concentración final 0.3%) y Tween-80 (concentración final 1%) a 25 grados centígrados seguido por incubación a la misma temperatura durante 6 horas.

Adsorción Sucesiva

El plasma tratado con S/D se fraccionó después en tres etapas de adsorción sucesivas:

- Columna A: Como se describe en el ejemplo 10
- Columna B: Como se describe en el ejemplo 5
- Columna C: Como se describe en el ejemplo 13

La Columna A se realizó como se describe en el ejemplo 10. La fracción de corrida-a través y de lavado combinadas se ajustó a pH 5.0 con el ácido clorhídrico 1 M y se diluyó con agua para obtener una dilución final en relación con el volumen de la materia prima que corresponde con 1+2 (como se describe en el ejemplo 5) y se aplicó después 120 ml de la solución de proteína diluida a la columna B como se describe en el ejemplo 5. La fracción de corrida-a través y de lavado combinadas a partir de la columna B se recogió, se pre-trató y procesó como se describe en el ejemplo 13. Para todas las tres columnas todas las fracciones de proteínas de la elución se recogieron y analizaron como se describe en los ejemplos respectivos.

Resultados

El análisis de todos los eluatos de la columna dio esencialmente los mismos resultados que se describen en los ejemplos individuales. Así, la etapa de eliminación de virus por el tratamiento de S/D no interfirió con el fraccionamiento de las proteínas cuando se usan los adsorbentes seleccionados. Al mismo tiempo no se pudo detectar Tween-80 ni fosfato de tri-n-butilo en cualquiera de las fracciones de proteínas aisladas que sorprendentemente ilustran que ninguno de los adsorbentes

elegidos enlaza esas sustancias. Las fracciones de proteínas aisladas se redujeron, por lo tanto de manera eficiente para las sustancias eliminación de virus simultáneamente con la separación real de las proteínas y no se necesitaron etapas adicionales para eliminar estas a partir de las proteínas aisladas.

- 5 El experimento ilustra además la separación consecutiva con éxito de las proteínas plasmáticas humanas en las siguientes 6 en total fracciones de proteínas diferentes que tienen muy poca contaminación cruzada y muy alto rendimiento: A. Factores de coagulación y anti-coagulación, B. albúmina, C. IgG y transferrina, D. fibrinógeno, E. inhibidor de la alfa-1-proteinasa y F. alfa-1-ácido glicoproteína.
- 10 La experimentación adicional con intercambio del orden de las etapas de adsorción demostraron que:
- La Columna A debe ser primero para evitar la inactivación de los factores de coagulación a un pH 5.0 (usado para la columna B)
 - La Columna C debe ser después de la columna B para evitar la excesiva unión de la albúmina a la columna C y la sería contaminación consiguiente del inhibidor de la alfa-1-proteinasa.
- 15

Referencias

- 20 Cohn y otros, "Separation into Fractions of Protein and Lipoprotein Components" J. Am. Chem. Soc, 68, 459-475, 1946
E. J. Cohn y otros, Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins, IV, A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids, The Journal of the American Chemical Society, vol. LXVIII (Ene.-Jul. 1946), págs. 459-475
Scand. J. Immunol. Vol. 17, Suppl. 10, 41-56, 1983
Finette G.M.S. y otros, Biotechnol. Prog., 1998, 14, págs. 286-293
- 25 Malvern Instruments Ltd (Worcestershire, Reino Unido) en su guía de operación (MAN 0320 Tema 1.0 Mar. 2004) en Mastersizer 2000E
US 2,390,074
US 2,469,193
US 6,617,133
- 30 US 6,036,861
US 4,481,189
EP 0 722 771
WO 01/85329
WO 92/18237
- 35 WO 2000/25884
WO 02/05923
WO 99/65586
WO 00/57982
WO 99/51316
- 40 WO 92/00799
WO 92/16292

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para el aislamiento a gran escala de proteínas a partir de una solución de proteína en donde la solución de proteína se obtiene a partir de sangre humana, tales como suero humano y/o plasma humano, en cuyo proceso la albúmina e IgG se separan uno del otro, comprendiendo dicho proceso la etapas de:
- 10 a) ajustar opcionalmente el pH de la solución de proteína a un pH preestablecido;
 b) ajustar opcionalmente la fuerza iónica o conductividad de la solución de proteína a una fuerza iónica preestablecida o conductividad iónica preestablecida;
 15 c) aplicar dicha mezcla a una columna de adsorción que comprende un adsorbente, dicho adsorbente comprende una partícula con al menos un núcleo no poroso de alta densidad rodeado por un material poroso, el adsorbente comprende una densidad de partículas de al menos 1.5 g/ml y un diámetro medio de partículas en volumen de a lo sumo 150 µm;
 d) lavar una o más de las proteínas a ser aislados a través del adsorbente, sin que una o más proteínas se enlazaran específicamente al adsorbente, para obtener una fracción de material no-enlazado;
 e) someter el adsorbente a un tampón de elución para eluir al menos una de las proteínas específicamente enlazada al adsorbente;
- 20 en donde ya sea:
- la albúmina e IgG se obtienen a partir del adsorbente por elución gradual; o
 la albúmina se obtiene como el material no-enlazado a partir del adsorbente y posteriormente la IgG se obtiene a partir del adsorbente por elución gradual.
- 25 2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un proceso de adsorción en lecho expandido.
3. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde, después de la etapa (e), el adsorbente se somete a al menos un tampón de elución adicional para eluir al menos una proteína adicional específicamente enlazada al adsorbente.
- 30 4. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la solución de proteína no se suplementó con un alcohol.
- 35 5. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la solución de proteína se somete a al menos un tratamiento de eliminación de virus.
6. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde al menos un tratamiento de eliminación de virus se realiza antes de contactar la solución de proteína con el adsorbente.
- 40 7. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en donde el tratamiento de eliminación de virus implica la adición de detergente y/o un disolvente orgánico, tales como Tween, Tritón, tri-n-butilfosfato, en la solución de proteína.
- 45 8. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde en el proceso el adsorbente comprende un polímero de matriz funcional que porta una pluralidad de grupos funcionales unidos covalentemente que comprenden un sistema de anillo aromático o heteroaromático y/o uno o más grupos ácidos.
- 50 9. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el grupo funcional se selecciona del grupo que consiste de ácido 2-mercaptobenzoico, ácido 2-mercaptonicotínico, ácido 2-aminobenzoico, ácido 3-aminobenzoico, y ácido 4-aminobenzoico, ácido 4-hidroxifenil-mercapto-acético, ácido 4-hidroxifenil-mercapto-propiónico, ácido 4-hidroxifenil-mercapto-butanoico, ácido 2,3-dihidroxi-benzoico, ácido 2,4 dihidroxi-benzoico, ácido 2,5 di-hidroxi-benzoico, ácido 2,6 dihidroxi-benzoico, ácido 3,4-dihidroxi-benzoico, ácido 3,5-dihidroxi-benzoico, ácido mercaptobencimidazol sulfónico, ácido ortanílico, ácido 3,4-dihidroxi-benzoico, ácido sulfanílico, ácido 4-metilanilina-2-sulfónico, ácido 4-metoxianilina-2-sulfónico, ácido anilina-2,5-disulfónico, ácido N-metilmetanílico, ácido 7-amino-1-naftol-3-sulfónico, ácido 1-naftol-4-sulfónico, ácido 2-naftol-6-sulfónico y ácido 2-hidroxi-3-naftoico, y ácido 2-mercaptobenzimidazol-sulfónico, ácido 3,4-diaminobenzoico, y ácido 2-(4-aminofenil)to acético.
- 55

- 5
- 10
10. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde otras proteínas sangre humana son seleccionadas del grupo que consiste de IgA, IgM, IgD, IgE, inhibidor de la alfa-1-proteinasa, proteína pro-coagulación de la sangre, proteína anti-coagulación de la sangre, agente trombolítico, proteína anti-angiogénica, α -2-antiplasmina, inhibidor de la esterasa C-1, apolipoproteína, HDL, LDL, Fibronectina, beta-2-glicoproteína I, fibrinógeno, plasminógeno, plasmina, activador de plasminógeno, inhibidor del plasminógeno, inhibidor de la proteasa plasmática, anti-trombina III, estreptoquinasa, inhibidor de inter-alfa-tripsina, α -2-macroglobulina, proteína amiloide, ferritina, pre-albúmina, GC-globulina, haemopexina, complemento-C3, transferrina, uroquinasa, α -1-ácido-glicoproteína, y los factores de coagulación o anti-coagulación tales como Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, factor von Willebrand, complejo Factor VIII - factor von Willebrand, Factor IX, Factor X, Factor XI, inhibidor C 1, proteína C y/o proteína S.
11. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos dos fracciones de proteínas son proporcionados por el proceso.
12. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde cada uno de las fracciones de proteínas obtenidas en el proceso tienen una cantidad de contaminación cruzada de proteínas de menos del 20%.
13. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos 2, tal como 3, por ejemplo 4, tal como 5, por ejemplo 6 de las proteínas seleccionadas del grupo que consiste de IgA, IgM, IgD, IgE, inhibidor de la alfa-1-proteinasa, proteína pro-coagulación de la sangre, proteína anti-coagulación de la sangre, agente trombolítico, proteína anti-angiogénica, α -2-antiplasmina, inhibidor de la esterasa C-1, apolipoproteína, HDL, LDL, Fibronectina, bet-2-glicoproteína I, fibrinógeno, plasminógeno, plasmina, activador de plasminógeno, inhibidor del plasminógeno, inhibidor de la proteasa plasmática, anti-trombina III, estreptoquinasa, inhibidor de inter-alfa-tripsina, α -2-macroglobulina, proteína amiloide, ferritina, pre-albúmina, GC-globulina, haemopexina, complemento-C3, transferrina, uroquinasa, α -1-ácido-glicoproteína, y los factores de coagulación o anti-coagulación tales como Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, factor von Willebrand, complejo Factor VIII - factor von Willebrand, Factor IX, Factor X, Factor XI, inhibidor de C1, proteína C y/o proteína S se separan simultáneamente uno de otro en al menos 2, tal como 3, por ejemplo 4, tal como 5, por ejemplo 6 fracciones individuales de proteína.
14. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos 2, tal como 3, por ejemplo 4, tal como 5, por ejemplo 6 de las proteínas seleccionadas del inhibidor de la α -1-proteinasa, transferrina, trombina, Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, proteína C, Proteína S, α -1-ácido-glicoproteína y fibrinógeno se separan una de la otra simultáneamente en al menos 2, tal como 3, por ejemplo 4, tal como 5, por ejemplo 6 fracciones de proteínas individuales.
15. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el fibrinógeno se enlaza al adsorbente y simultáneamente uno o más de los factores de la coagulación o anti-coagulación tales como el Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor de von Willebrand, complejo del Factor VIII - factor de von Willebrand, Factor IX, Factor X, Factor XI, inhibidor C1, proteína C y/o Proteína S se obtienen como material no enlazado al adsorbente.
16. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la albúmina e IgG se enlazan al adsorbente y se obtiene simultáneamente el inhibidor-1- α -proteinasa como material no enlazado a partir del adsorbente.
17. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el fibrinógeno e IgG se unen al adsorbente y simultáneamente se obtiene la albúmina como material no enlazado a partir del adsorbente.
18. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el fibrinógeno e IgG se obtienen un partir del adsorbente mediante la elución gradual.
19. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el fibrinógeno, albúmina e IgG se enlazan al adsorbente y simultáneamente se obtiene el inhibidor-1- α -proteinasa como material no enlazado a partir del adsorbente.

55

20. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el fibrinógeno, albúmina e IgG se obtienen un partir del adsorbente mediante elución gradual.
- 5 21. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos 1, tal como al menos 2, por ejemplo 3 de fibrinógeno, albúmina e IgG se enlaza/enlazan al adsorbente y simultáneamente la α -1-ácido-glicoproteína se obtiene como material no enlazado al adsorbente.
- 10 22. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos 1, tal como al menos 2 por ejemplo 3 de fibrinógeno, albúmina e IgG se enlaza/enlazan al adsorbente y simultáneamente la α -1-ácido-glicoproteína y/o el inhibidor de la α -1-proteinasa se obtiene/obtienen como material no enlazado al adsorbente.
23. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la fracción de material no enlazado comprende la albúmina.
- 15 24. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1-10, en donde uno o más factores de la coagulación o factores de la anti-coagulación seleccionados del grupo que consiste de Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor de von Willebrand, complejo del Factor VIII - factor de von Willebrand, Factor IX, Factor X, Factor XI, inhibidor de C1, proteína C y Proteína S se enlaza al adsorbente en una primera iteración del proceso.
- 20 25. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 24, en donde al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste de albúmina, IgG, transferrina y fibrinógeno se enlaza al adsorbente en una segunda iteración del proceso.
- 25 26. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 25, en donde al menos un inhibidor de la proteína seleccionada a partir del inhibidor de la α -1-proteinasa o α -1-ácido glicoproteína se enlaza al adsorbente en una tercera iteración del proceso.
27. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 24 en donde se eluyen uno o más factores de la coagulación o factores de la anti-coagulación a partir del adsorbente individualmente en etapas de elución separadas.

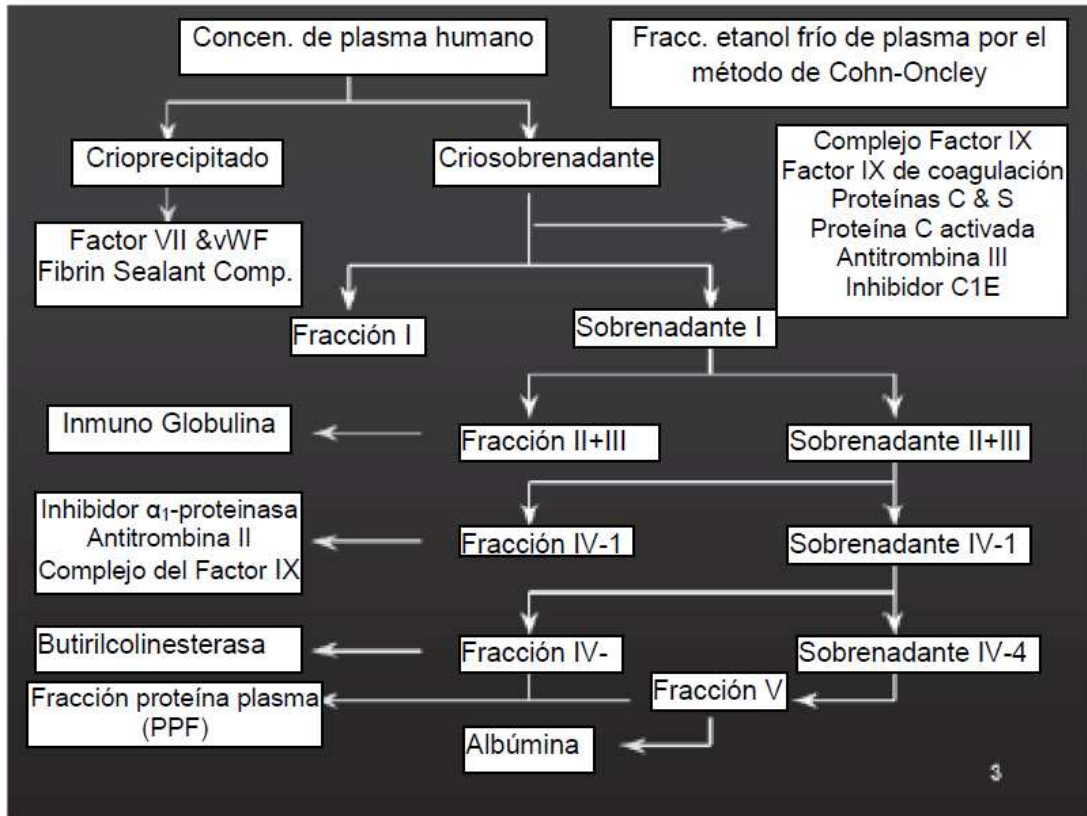


Fig. 1

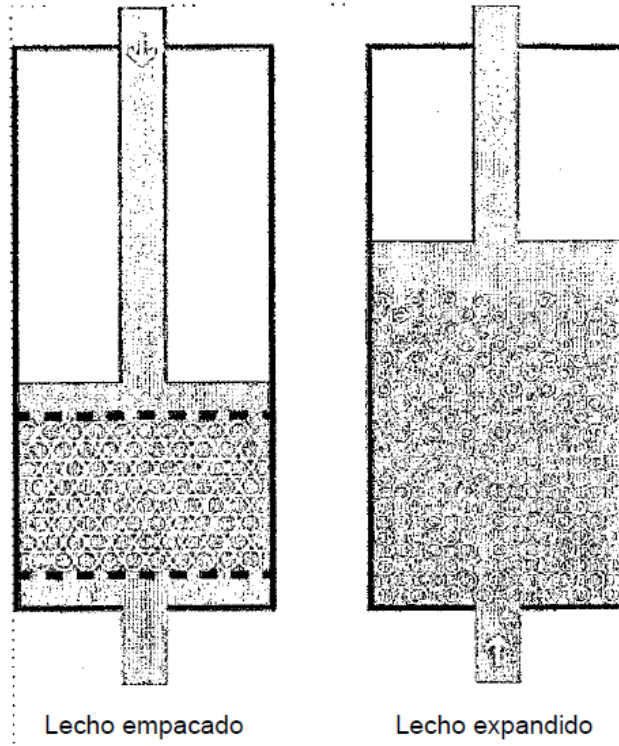


Fig. 2

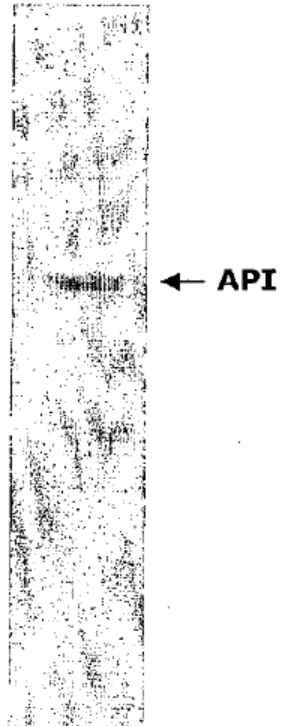


Fig. 3

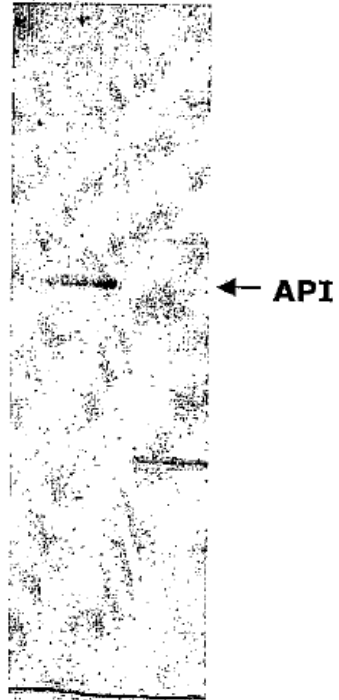


Fig. 4

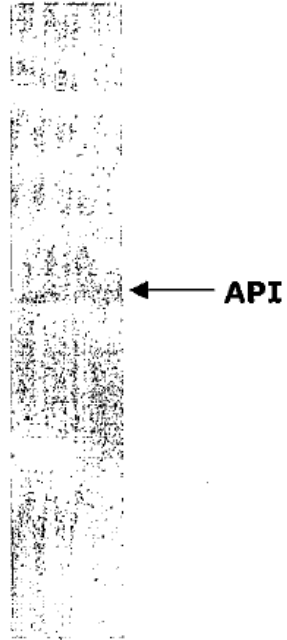


Fig. 5