

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 352**

51 Int. Cl.:

**A61L 2/00** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C07K 1/16** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2008 E 08787446 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2190486**

54 Título: **Procedimiento de aislamiento y purificación de proteína diana exenta de proteínas priónicas (PrP<sup>Sc</sup>)**

30 Prioridad:

**23.08.2007 EP 07114856**

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

**31.05.2016**

73 Titular/es:

**OCTAPHARMA AG (100.0%)  
SEIDENSTRASSE 2  
8853 LACHEN, CH**

72 Inventor/es:

**GILLJAM, GUSTAV;  
JERNBERG, MATS;  
WINGER, STEFAN y  
NEISSER-SVAE, ANDREA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 572 352 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

Procedimiento de aislamiento y purificación de proteína diana exenta de proteínas priónicas (PrP<sup>SC</sup>)

La presente invención se refiere a un procedimiento de aislamiento y purificación de una proteína diana que está exenta de la forma de proteína asociada a enfermedad PrP<sup>SC</sup>.

5 En tiempos recientes, el enfoque en la inactivación de PrP<sup>SC</sup> y su eliminación por procedimientos de purificación para fármacos derivados de plasma sanguíneo cada vez está recibiendo mayor atención. Obviamente, la razón ha sido el brote de la enfermedad de las vacas locas, etc. Incluso el uso de líneas celulares recombinantes para la producción de fármacos biofarmacéuticos no se considera completamente seguro, por la aparición de proteínas priónicas (Vorberg *et al.*, The Journal of Infectious diseases, 2004, 189:431-439, Susceptibility of common fibroblast cell lines to transmissible spongiform encephalopathy agents). Durante los trabajos para definir un procedimiento de purificación para proteínas dirigidas a constituir fármacos biofarmacéuticos, pueden evaluarse diferentes etapas de purificación como posibles etapas de eliminación de proteínas priónicas (Foster P.R., *et al.*, Distribution of a bovine spongiform encephalopathy-derived agent over ion exchange chromatography used in the preparation of concentrates of fibrinogen and factor VIII, Vox Sang., 2004, febrero, 86(2):92-99; Trejo S.R., *et al.*, Evaluation of virus and prion reduction in a new intravenous immunoglobulin manufacturing process, Vox Sang., 2003, abril, 84(3):176-187; Zeiler B., *et al.*, Concentration and removal of prion proteins from biological solutions, Biotechnol. Appl. Biochem., 2003, abril, 37(pt. 2):173-182; Foster *et al.*, Studies on the removal of abnormal prion protein by processes used in the manufacture of human blood plasma products, Vox Sang., 2000, 78:86-95; Burnouf *et al.*, Transfus. Clin. Biol., 2006, noviembre, 13(5):320-328, Epub, 23 de enero de 2007, Current strategies to prevent transmission of prions by human plasma derivatives.

Las resinas de cromatografía han mostrado ser capaces de contribuir a la eliminación de PrP<sup>SC</sup> en un procedimiento de purificación (referencia 2-4, 6-7). Sin embargo, se ha indicado que el hecho de que se encuentren factores de eliminación de PrP<sup>SC</sup> constantes en los procedimientos que emplean resinas cromatográficas de estructura química y sustituciones diferentes y con diferentes sistemas de tampón facilita la aparición de uniones no específicas del agente infeccioso a la superficie del soporte cromatográfico. Aunque la eliminación de las PrP<sup>SC</sup> parece ser reproducible, la comprensión incompleta del mecanismo de eliminación sigue planteando preguntas, tales como (a) cómo determinar la capacidad máxima del soporte cromatográfico para unirse a agentes TSE, (b) cómo asegurar unos procedimientos de asepsia eficaces de los geles reciclados, y (c) cómo garantizar una eliminación de PrP<sup>SC</sup> constante a través de los ciclos de producción (Thyer J., Prion-removal capacity of chromatographic and ethanol precipitation steps used in the production of albumin and immunoglobulins, Vox Sang., 2006, noviembre, 91(4):292-300).

El documento WO-A-98/0041 divulga la eliminación de un príon de otras proteínas, por ejemplo, hemoglobina, mediante una cromatografía de intercambio iónico. La preparación del medio cromatográfico de intercambio iónico revela un gel de sílice derivatizado con (g-glicidoxipropil)trimetoxisilano y dimetanolamina para obtener una superficie (uniforme) de grupos amonio cuaternario.

El documento WO-A-03/105911 divulga un procedimiento de limpieza de plasma humano por medios convencionales de cromatografía de intercambio iónico empleando un gradiente salino para la elución.

El documento WO-A-94/08686 divulga un procedimiento para realizar, de un modo consecutivo, diferentes apuntes de la separación cromatográfica en una columna de cromatografía líquida empleando un único medio de separación.

D.B. Brimacombe *et al.*, en Biochem. J. (1999), 342, 605-613 divulgan la purificación de recPrP mediante dos etapas cromatográficas sucesivas. La primera etapa es una cromatografía de intercambio catiónico (gradiente de NaCl 150-650) realizada sobre S-Sepharose. Los eluatos reunidos de interés se someten a una segunda etapa cromatográfica (Sepharose quelante cargado con cinc; gradiente de imidazol 0-100 mM).

45 P.R. Foster *et al.*, Vox Sanguinis, 2000, 78:86-95, divulgan la eliminación de proteínas priónicas en la fabricación de productos de plasma mediante múltiples etapas. Este procedimiento comprende 4 cromatografías de intercambio iónico (etapas 2, 11, 13 y 15) y una cromatografía de afinidad (heparina inmovilizada sobre Sepharose-FF; etapa 12) realizadas en diferentes columnas en diferentes geles cromatográficos.

50 T. Burnouf *et al.*, publican en Transfusion Clinique et Biologique, 13 (2006), 320-328, el grado de eliminación del agente TSE durante diversas etapas cromatográficas de factores de la coagulación derivados de plasma. La publicación se centra en diversas etapas cromatográficas de intercambio iónico (en su mayor parte) empleadas en la producción de FVIII (DEAE-Toyopearl 650M), vWF (DEAE-Toyopearl 650M), fibrinógeno (DEAE-Toyopearl 650M), complejo de protrombina/FIX (DEAE-celulosa), PCC (DEAE-Sepharose), FIX (DEAE-Sepharose o heparina-Sepharose) y trombina (S-Sepharose). Todos estos sistemas se investigaron por separado.

J. Thyer *et al.*, en *Vox Sanguinis*, (2006)91, 292-300, informan de la reducción de PrP en columnas cromatográficas de DEAE-Sepharose, CM-Sepharose y Macro-Prep High Q ("Materials and Methods"; fig. 1, p. 294; tabla 1). En otro experimento, se divulga el uso de secuencial de una columna de DEAE-Sepharose y una columna de CM-Sepharose- o Macro-Prep.

5 Un objeto de la invención es proporcionar un procedimiento cromatográfico que elimina las PrP<sup>SC</sup> durante los procedimientos de fraccionamiento de fuentes que están potencialmente contaminadas por PrP<sup>SC</sup>, tales como fuentes de origen biológico. El procedimiento deber evitar los inconvenientes de la técnica anterior. Otro objeto consiste en diseñar un procedimiento que hace que el procedimiento de purificación sea fiable y permite la regeneración de los soportes cromatográficos.

10 Otro objeto de la invención es proporcionar una fracción de proteínas con menor cantidad de priones.

Se divulga un procedimiento para el aislamiento y la purificación de una proteína diana mediante una cromatografía, en el que se proporciona una cromatografía que elimina o disminuye la cantidad de priones (PrP<sup>SC</sup>) que comprende las etapas de:

15 - poner en contacto una muestra potencialmente contaminada con PrP<sup>SC</sup> que comprende una proteína diana, con un material cromatográfico multimodal;

- establecer las condiciones del tampón de modo que la proteína diana se una al material cromatográfico multimodal y las PrP<sup>SC</sup> no se unan al material cromatográfico multimodal;

- seguido de la adición de la proteína diana, y

- recolectar la proteína diana.

20 Esto proporciona una mejora significativa, porque la resina cromatográfica se une a las PrP<sup>SC</sup> con menos fuerza, lo cual permite la eliminación de las PrP<sup>SC</sup> de la resina cromatográfica antes de eluir la proteína diana.

### **Sumario de la invención**

25 Según la invención, "aislamiento y purificación" significa, en particular, procedimientos que se emplean para al menos enriquecer cualquier sustancia de tipo proteínico deseada o procedimientos que disminuyen la cantidad de sustancias no deseadas. Según la invención, sería ventajoso obtener el producto deseado de la forma más pura posible.

La expresión "proteína diana" significa una proteína de interés de debe ser aislada y/o purificada de PrP<sup>SC</sup>. La proteína diana también puede ser una mezcla concreta de proteínas si así se desea, por ejemplo, una mezcla de diferentes factores que tienen un efecto biológico cuando actúan juntos.

30 Los "priones" son sustancias proteicas infecciosas.

Según la invención, se proporciona un procedimiento para el aislamiento y la purificación de una proteína diana mediante una cromatografía, en el que la cromatografía elimina o disminuye la cantidad de priones (PrP<sup>SC</sup>), que comprende las etapas de:

35 - poner en contacto una muestra potencialmente contaminada con PrP<sup>SC</sup> que comprende una proteína diana, con un material cromatográfico multimodal, en el que el material cromatográfico multimodal contiene un ligando de ácido 2-(benzoilamino)butanoico cargado negativamente;

- establecer las condiciones del tampón de modo que la proteína diana se una al material cromatográfico multimodal, mientras que las PrP<sup>SC</sup> no se unan al material cromatográfico multimodal, en el que las condiciones cromatográficas comprenden al menos dos de las siguientes etapas:

40 i) emplear un tampón de carga y equilibrio que contiene tri-n-butilfosfato y/o Triton X-100 en una concentración que varía del 0,1 al 10% (en p/p);

ii) emplear un tampón de lavado sin disolvente y/o detergente no iónico;

iii) emplear un segundo tampón de lavado que contiene etilenglicol y/o lisina/arginina que varía del 5 al 30% (en p/p) de etilenglicol y de 0,2 a 1,5 M de lisina/arginina;

45 iv) emplear un tercer tampón de lavado que contiene cloruro de sodio en una concentración que varía de 0,5 a 4 M, en particular de 0,5 a 1,5 M;

- seguido de la elución de la proteína diana.

En una realización de la invención, el procedimiento comprende además:

v) emplear un cuarto tampón de lavado que contiene cloruro de sodio en una concentración que varía de 0,01 a 0,2, en particular de 0,01 a 0,1 M;

5 vi) emplear un tampón que contiene etilenglicol y/o cloruro de sodio que tiene una concentración que varía del 25 al 75% (en p/p), en particular del 25 al 50% de etilenglicol y de 0,5 a 4 M de NaCl en lugar de la etapa iii).

En otra realización de la invención, la proteína diana se eluye después de la elución de los priones por medio de:

- un cambio en la fuerza iónica del tampón de elución mediante el aumento o la disminución de la fuerza iónica,

10 - la adición de alcoholes al tampón de elución (en particular en disolución acuosa), tales como mono- o dihidroxialcanoles, por ejemplo, alcoholes alifáticos inferiores, tales como metanol, etanol, propanol, y/o

- un cambio en el valor del pH del tampón de elución mediante el aumento o la disminución del pH.

Según el procedimiento de la invención, el valor de eliminación de las proteínas priónicas en la fracción de proteínas que comprende la proteína diana es  $> 1$  a  $4 \lg(10)$ , calculado a partir de la cantidad que se aplicó inicialmente a la resina.

15 Según la invención, el valor analítico de las proteínas priónicas en la fracción de proteínas de interés está por debajo del límite de detección del ensayo de transferencia Western de priones.

Según la invención, se proporciona un procedimiento para el aislamiento y la purificación de una proteína diana mediante una cromatografía, en el que la cromatografía elimina o disminuye la cantidad de priones ( $\text{PrP}^{\text{SC}}$ ), que comprende las etapas de:

20 - poner en contacto una muestra potencialmente contaminada con  $\text{PrP}^{\text{SC}}$  que comprende una proteína diana con un material cromatográfico multimodal, en el que el material cromatográfico multimodal contiene un ligando de ácido 2-(benzoilamino)butanoico cargado negativamente;

25 - establecer las condiciones del tampón de modo que la proteína diana se una al material cromatográfico multimodal, mientras que las  $\text{PrP}^{\text{SC}}$  no se unan al material cromatográfico multimodal, en el que las condiciones cromatográficas comprenden al menos dos de las siguientes etapas:

i) emplear un tampón de carga y equilibrio que contiene tri-n-butilfosfato y/o Triton X-100 en una concentración que varía del 0,1 al 10% (en p/p);

ii) emplear un tampón de lavado sin disolvente y/o detergente no iónico;

30 iii) emplear un segundo tampón de lavado que contiene etilenglicol y/o lisina/arginina que varía del 5 al 30% (en p/p) de etilenglicol y de 0,2 a 1,5 M de lisina/arginina;

iv) emplear un tercer tampón de lavado que contiene cloruro de sodio en una concentración que varía de 0,5 a 4 M, en particular de 0,5 a 1,5 M;

- seguido de la elución de la proteína diana.

En una realización de la invención, el procedimiento comprende además:

35 v) emplear un cuarto tampón de lavado que contiene cloruro de sodio en una concentración que varía de 0,01 a 0,2, en particular de 0,01 a 0,1 M;

vi) emplear un tampón que contiene etilenglicol y/o cloruro de sodio que tiene una concentración que varía del 25 al 75% (en p/p), en particular del 25 al 50% de etilenglicol y de 0,5 a 4 M de NaCl en lugar de la etapa iii).

En otra realización de la invención, la proteína diana se eluye después de la elución de los priones por medio de:

40 - un cambio en la fuerza iónica del tampón de elución mediante el aumento o la disminución de la fuerza iónica,

- la adición de alcoholes al tampón de elución (en particular en disolución acuosa), tales como mono- o dihidroxialcanoles, por ejemplo, alcoholes alifáticos inferiores, tales como metanol, etanol, propanol, y/o

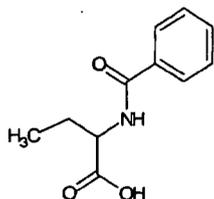
- un cambio en el valor del pH del tampón de elución mediante el aumento o la disminución del pH.

Según el procedimiento de la invención, el valor de eliminación de las proteínas priónicas en la fracción de proteínas que comprende la proteína diana es  $> 1$  a  $4 \lg(10)$ , calculado a partir de la cantidad que se aplicó inicialmente a la resina.

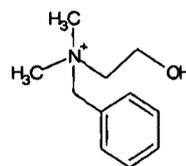
5 Según la invención, el valor analítico de las proteínas priónicas en la fracción de proteínas de interés está por debajo del límite de detección del ensayo de transferencia Western de priones.

### Descripción detallada de la invención

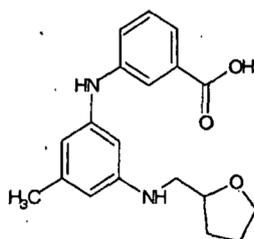
De modo sorprendente, se ha encontrado que una única resina cromatográfica ha sido capaz de minimizar la unión de PrP<sup>SC</sup> al gel bajo condiciones cromatográficas y, por tanto, se logran unos excelentes valores de reducción para el producto que se une a ella. Esta resina está disponible en el mercado y se divulga, por ejemplo, en el documento WO-A-2004/024318. La resina que ha demostrado tener este efecto hacia PrP<sup>SC</sup> se denomina resina multimodal (o de modo mixto o de inducción cargada hidrófoba). En oposición a, por ejemplo, medios cromatográficos convencionales, tales como resinas de cromatografía de intercambio iónico y de interacción hidrófoba, que actúan solo a través de un principio, las resinas multimodales actúan a través de una combinación de interacciones iónicas e interacciones hidrófobas. Los ejemplos de dichas resinas son las resinas disponibles en el mercado 10 Captó® MMC y Captó® Adhere de la empresa GE Healthcare, o las resinas MEP, HEA o PPA Hypercel® de la empresa PALL. Los ligandos de estas resinas multimodales pueden diseñarse de modos diferentes; a continuación



ácido 2-(benzoilamino)butanoico



N-bencil-2-hidroxi-N,N-dimetiletanaminio



ácido 3-((3-metil-5-((tetrahidrofuran-2-ilmetil)amino)fenil)amino)benzoico

se indican ejemplos de diferentes ligandos:

El tipo de material cromatográfico multimodal se resume a continuación.

20 Se divulga un sustrato sólido que es un adsorbente eficaz para su uso en la separación y el aislamiento de una diversidad de sustancias biológicas. El sustrato sólido de esta descripción puede emplearse, por ejemplo, en técnicas preparativas, tales como una cromatografía en columna, y en dispositivos analíticos, tales como biochips. Una ventaja del presente sustrato sólido descrito en la presente es su alta selectividad y especificidad para sustancias biológicas, tales como inmunoglobulinas, junto con la no utilización de los procedimientos de limpieza costosos y a menudo perjudiciales que requieren los sustratos de la técnica anterior. Una segunda ventaja es que 25 el sustrato sólido resulta casi idealmente adecuado para su uso con muestras biológicas a pH y fuerza iónica fisiológicos, obviando con ello la necesidad del ajuste del pH y la adición de sales liotrópicas, tal como se indica en la técnica anterior. Puede considerarse una tercera ventaja la alta capacidad de los presentes sustratos, que, en vista del bajo coste de los reactivos empleados para prepararlos, representa una significativa ganancia económica frente al uso de los adsorbentes especializados de la técnica anterior.

Ligando de modo mixto

5 Los sustratos sólidos comprenden un soporte sólido y un ligando unido al soporte sólido. El ligando comprende un grupo cíclico que puede ser un grupo monocíclico o un grupo policíclico, y un grupo conector que opcionalmente comprende un átomo de azufre. El ligando que atrae a los analitos a través de una acción de modo mixto está unido a un soporte sólido.

10 El ligando comprende un grupo cíclico, que puede ser un grupo monocíclico o un grupo policíclico, que está unido al soporte sólido y que está sustituido con un grupo sulfato, sulfonato, fosfato o fosfonato. Este grupo monocíclico o policíclico puede ser un grupo aromático, que, tal como se define en la presente, es un hidrocarburo cíclico que contiene solo enlaces carbono-carbono insaturados para producir un sistema aromático. Aunque en principio puede emplearse cualquier grupo aromático en la presente invención, un grupo aromático adecuado generalmente comprende uno, dos o tres anillos aromáticos. Así, los ejemplos de grupos aromáticos son fenilo y sus derivados sustituidos, tales como toliilo y xililo. Los grupos aromáticos bicíclicos comprenden anillos individuales condensados, e incluyen, pero no se limitan a naftilo. Los grupos aromáticos policíclicos incluyen antraceno y fenantreno, y grupos tales como acenafilenilo que contienen anillos condensados de diferente tamaño. Si se selecciona un grupo aromático, se prefiere, aunque no resulta fundamental, que el grupo esté condensado con un grupo heterocíclico o heteroaromático, tal como se describe a continuación.

20 Un "heterociclo" es un anillo saturado a parcialmente saturado que contiene al menos un heteroátomo. De modo similar, un "grupo heteroaromático" es un grupo aromático en el que al menos un átomo de carbono está sustituido por un heteroátomo. El heteroátomo preferiblemente es N, S, u O. También es preferible que el grupo heterocíclico o heteroaromático sea un anillo de cinco o seis miembros, puesto que los reactivos que comprenden estos grupos pueden adquirirse con facilidad y de forma barata en fuentes comerciales.

Cuando un grupo conector, tal como se define a continuación, no contiene un átomo de azufre ambivalente, entonces se prefiere que el grupo heterocíclico o heteroaromático sea un grupo que establezca o contribuya al carácter "tiofílico" del sustrato sólido, y así sea un grupo que contenga al menos un átomo de S.

25 Cuando se emplean otros grupos conectores que contienen átomos de azufre bivalente, preferiblemente los grupos heterocíclicos o heteroaromáticos pueden comprender al menos un átomo de N, o combinaciones de átomos de S y N.

30 Así, los ejemplos de grupos heterocíclicos o heteroaromáticos incluyen tiazolina, tiazolidona, imidazol, imidazolina, tiazol, triazoles, tetrazol, tiadiazol, imidazol, piridina y morfolina. En una realización particularmente preferida, un grupo heterocíclico o heteroaromático adecuado está condensado con un grupo aromático, tal como se describió anteriormente. En este contexto, el benzimidazol y el benzotiazol son candidatos que pueden adquirirse con facilidad, que producen unos sustratos sólidos mucho mejores.

35 Tal como se mencionó anteriormente, el grupo monocíclico o policíclico está sustituido con un grupo sulfato, sulfonato, fosfato o fosfonato. Estos grupos son lo suficientemente ácidos como para existir como restos cargados dentro de un intervalo grande de pH, por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 12. En este contexto, el soporte sólido es idealmente adecuado para adsorber sustancias biológicas, tales como inmunoglobulinas a una fuerza iónica y pH fisiológicos.

40 El término "sustituido", tal como se emplea en la presente, se refiere a la unión directa o indirecta de un grupo sulfato, sulfonato, fosfato o fosfonato al grupo monocíclico o policíclico. La unión indirecta puede realizarse a través de un grupo espaciador, que es un grupo alquileo  $C_{1-6}$  lineal o ramificado. El grupo alquileo está opcionalmente interrumpido por uno o más restos bivalentes que incluyen, pero no se limitan a  $-C(O)NH-$ ,  $NHC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-NH-$ ,  $-C(O)O-$ , y  $-OC(O)-$ . Así, los ejemplos de grupos espaciadores incluyen  $-CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2-$ ,  $-CH_2O-CH_2-$ , y  $-CH_2C(O)NHCH_2CH_2-$ .

45 El grupo monocíclico o policíclico está unido al soporte sólido a través de un grupo conector, que comprende un resto que contiene mercapto, éter, o amino. Sometido a las consideraciones estructurales descritas a continuación, se prefiere que el grupo conector sea hidrófobo, y por tanto confiere un carácter hidrofóbico al soporte sólido a un pH en el que se produce la unión de una sustancia biológica a través de interacciones electrostáticas e hidrofobas. Los restos hidrófobos incluyen, pero no se limitan a grupos alquileo  $C_{1-6}$ , grupos alquilenilo  $C_{2-6}$ , y grupos alquilenilo  $C_{2-6}$  lineales y ramificados. Los restos particularmente útiles son etileno y propileno. Otros restos hidrófobos comprenden un grupo aromático, tal como se describió anteriormente, para formar, por ejemplo, fenileno. Por tanto, los anteriores restos están interrumpidos o cerrados por al menos un resto mercapto, éter o amino. En realizaciones en las que un grupo monocíclico o policíclico no comprende un átomo de azufre, el grupo conector preferiblemente contiene un resto mercapto. A este respecto, el grupo conector confiere un carácter hidrófobo y tiofílico al sustrato sólido. Un grupo conector que contiene mercapto preferido se representa mediante la fórmula:

La hidrofobicidad del grupo conector puede ajustarse con facilidad introduciendo sustituyentes polares, tales como hidroxilo, un haluro, o nitro; oxidando un resto mercapto por procedimientos conocidos; incorporando restos éter o amino en el grupo conector; o sus combinaciones. Así, uno de estos grupos conectores que contienen mercapto que puede ser accedido con facilidad está representado por la fórmula:

5 Preferiblemente, los sustratos sólidos que comprenden grupos conectores que contienen amino, o los que contienen restos mercapto oxidados, también comprenden grupos monocíclicos o policíclicos que comprenden al menos un átomo de S. A este respecto, el sustrato sólido es capaz de conservar parte del carácter tiofílico.

10 El propio grupo conector puede comprender un polisacárido, tal como hidroxietilcelulosa, almidón, amilosa, o agarosa. Un polisacárido preferido en este contexto es el dextrano. Así, el soporte sólido se modifica con un polisacárido, que puede derivatizarse con un grupo conector, tal como se describe a continuación.

15 Sin pretender quedar limitados por teoría alguna, los inventores creen que el sustrato sólido actúa a través de "modos mixtos" de interacción entre el sustrato sólido y una sustancia biológica. Los grupos monocíclicos y policíclicos mencionados anteriormente tiene un valor de pK menor que 4 y, por tanto, están cargados negativamente dentro de los intervalos de pH utilizados tal como se describió anteriormente. Una sustancia biológica, tal como una inmunoglobulina, se pone en contacto con el sustrato sólido a un pH entre aproximadamente pH 4 y pH 6, en cuyo intervalo la sustancia biológica porta una carga neta positiva o neutra. En este intervalo de pH, la sustancia biológica se une al sustrato sólido a través de uno o más tipos de interacciones con los grupos mono- o policíclicos. Las interacciones incluyen atracciones coulombicas y asociaciones hidrófobas débiles. Cuando el pH aumenta por encima de aproximadamente 8, la sustancia biológica adquiere una cara neta negativa, creando con una repulsión electrostática entre el sustrato sólido cargado negativamente y la sustancia biológica cargada negativamente. Por consiguiente, la sustancia biológica se libera debido a la repulsión electrostática del sustrato sólido y, después, puede aislarse. Se cree que estas fuerzas iónicas repulsivas son más fuertes que las fuerzas atractivas más débiles indicadas anteriormente.

20

#### Sustrato sólido

25 Se divulga un soporte sólido al cual está unido el ligando de modo mixto. Se contemplan dos formatos diferentes en particular. En un formato, el soporte sólido tiene la forma que generalmente se emplea para medios cromatográficos, es decir, una perla o una partícula. Estas perlas o partículas se derivatizan con el ligando de modo mixto. Las perlas o partículas forman un medio cromatográfico que se puede emplear para cargar la columna. En otro formato, el soporte sólido toma la forma de un chip, es decir, un soporte sólido que tiene una superficie en general plana, a la cual puede unirse el ligando de modo mixto de manera covalente o de otra manera. Los chips que están adaptados para unirse a una interfase de sonda de un dispositivo de detección también se denominan "sondas."

30

#### Perlas y partículas

35 El sustrato sólido primero comprende un soporte sólido, que puede comprender un material orgánico. Los ejemplos de materiales orgánicos son los polisacáridos, tales como celulosa, almidón, agar, agarosa, y dextrano. Se contemplan los polímeros hidrófilos sintéticos, que incluyen poli(acrilamidas, polimetacrilamidas, poli(acrilatos, polimetacrilatos, polímeros hidrófilos de polivinilo, poliestireno, polisulfona, y copolímeros de estireno y divinilbenceno sustituidos o no sustituidos. Como alternativa, pueden utilizarse materiales inorgánicos como material de soporte sólido. Estos materiales inorgánicos incluyen, pero no se limitan a materiales minerales porosos, tales como sílice; hidrogel que contiene óxido de sílice, óxido de circonio, óxido de titanio, óxido de aluminio; y otros materiales cerámicos. También es posible emplear mezclas de estos materiales, o materiales compuestos formados por copolimerización o por una red interpenetrada de dos materiales, tales como los descritos en los documentos US-A-5.268.097, US-A-5.234.991, y US-A-5.075.371.

40

45 El soporte sólido puede estar en forma de perlas o partículas irregulares de un diámetro de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1.000 mm. Como alternativa, el soporte sólido puede conformarse en fibras, membranas o materiales similares a esponjas atravesados por orificios con un tamaño de micrómetros a varios milímetros.

50 Los grupos monocíclicos o policíclicos descritos anteriormente están químicamente inmovilizados sobre el soporte sólido mediante la formación de enlaces covalentes entre el soporte sólido y el grupo conector, y entre el grupo conector y los grupos monocíclicos o policíclicos. En los escenarios típicos, el soporte sólido primero se trata con un reactivo bifuncional que actúa para introducir grupos reactivos sobre el soporte sólido que forman parte del grupo conector o son el grupo conector completo. Para algunos soportes sólidos, tales como la celulosa, los materiales compuestos que contienen un hidrogel u otros materiales que presentan grupos hidroxilo, a menudo resulta ventajoso desprotonar los grupos hidroxilo con una fuente de hidróxido, por ejemplo, antes de la reacción con un reactivo bifuncional. El reactivo bifuncional es capaz de reaccionar con el soporte sólido y con los reactivos que contienen los grupos monocíclicos o policíclicos. Los ejemplos de reactivos bifuncionales, que contienen

55

grupos funcionales idénticos o diferentes, incluyen, pero no se limitan a epiclorhidrina, epibromhidrina, dibromo- y dicloropropanol, dibromobutano, etilenglicol diglicidil éter, butandiol diglicidil éter, divinilsulfona, alil diglicidil éter, y bromuro de alilo.

5 Tras haber sido funcionalizado, el soporte sólido después se lava a fondo con uno o más disolventes para eliminar el reactivo bifuncional sin reaccionar, los subproductos de la reacción o ambos. Un disolvente típico que se emplea a este respecto es el agua.

Después se introducen los grupos monocíclicos o policíclicos por medio de reactivos que contienen dichos grupos sustituidos con grupos mercapto, hidroxilo o amino. Estos reactivos reaccionan con los grupos funcionales presentados por el soporte sólido funcionalizado, tal como se describió anteriormente.

10 El apareamiento concreto de un reactivo bifuncional con un reactivo monocíclico o policíclico está dirigido por químicas muy conocidas. Por ejemplo, los soportes sólidos que están funcionalizados con epóxidos pueden sufrir reacciones con reactivos que contienen mercapto, hidroxilo o amino para producir un sustrato con grupos conectores que contienen etileno. Otros soportes sólidos modificados con bromuro de alilo, por ejemplo, presentan grupos alqueno que pueden reaccionar directamente con reactivos que contienen mercapto. Como alternativa, los grupos  
15 alqueno también pueden bromarse para producir derivados de bromo adecuadamente reactivos.

La concentración del grupo monocíclico o policíclico inmovilizado puede variar entre una fracción de un micromol a varios cientos de micromoles por mililitro de soporte sólido, dependiendo de la concentración del reactivo bifuncional utilizada para fabricar el soporte sólido.

20 Unas bajas concentraciones del grupo inmovilizado generalmente provocan una baja capacidad de separación del sustrato sólido, mientras que unas altas concentraciones generalmente conducen a una mayor capacidad.

Tal como se describió anteriormente, existen varias ventajas con una resina de eliminación de PrP<sup>SC</sup> que principalmente no se une a las PrP<sup>SC</sup>, siendo una la posibilidad de lavar a fondo la resina con diferentes composiciones de tampón antes de eluir el producto, lo cual permite al menos reducir el número de PrP<sup>SC</sup> de composición bioquímica diferente hasta un nivel muy bajo, o eliminar las PrP<sup>SC</sup> de la composición. Por ejemplo, es  
25 posible lavar la resina con diferentes tipos de tampones de lavado, que incluyen tampones con contenido salino alto o bajo para interrumpir la interacción iónica o hidrófoba, en la que una cantidad más pequeña de priones puede estar uniéndose a la resina o incluso al producto, antes de eluir el producto. Los detergentes, alcoholes y aminoácidos también son ejemplos, que pueden añadirse a los tampones de lavado para lograr una pureza óptima antes de eluir el producto. Resulta significativamente más difícil realizar una etapa de lavado similar con otros tipos  
30 de medios cromatográficos "convencionales" tales como, por ejemplo, diferentes tipos de resinas de intercambio iónico, en las que las PrP<sup>SC</sup> se unen a la resina. Incluso aunque la afinidad de unión sea muy alta, si se compara con el producto, siempre existirá el riesgo de que las PrP<sup>SC</sup>, en algún grado, coeluyan de la resina junto con el producto. Por tanto, existe una enorme ventaja en la utilización de una resina en la que el producto "multimodal" se une a la resina, en la que las PrP<sup>SC</sup> tienen una afinidad relativamente baja con la resina, lo cual hace posible  
35 aplicar las etapas de lavado apropiadas antes de eluir el producto.

Según la invención, la proteína diana se eluye después de la elución de las PrP<sup>SC</sup> por medio de:

- un cambio en la fuerza iónica del tampón de elución mediante el aumento o la disminución de la fuerza iónica,
- la adición de alcoholes al tampón de elución (en particular en disolución acuosa), tales como mono- o dihidroxialcanoles, por ejemplo, alcoholes alifáticos inferiores, tales como metanol, etanol, propanol, y/o
- 40 - un cambio en el valor del pH del tampón de elución mediante el aumento o la disminución del pH.

También puede emplearse una combinación de las técnicas de elución descritas. Por ejemplo, la invención emplea una mayor fuerza iónica y una mayor cantidad de etilenglicol.

También pueden utilizarse otras condiciones de elución, tales como una mayor concentración de aminoácidos, y mayores concentraciones con sales específicas según la "serie de Hofmeister".

45 La elución de la proteína diana depende de la propiedad bioquímica de la proteína diana. Por ejemplo, es posible utilizar la coenzima de la proteína diana u otras sustancias con un alto reconocimiento hacia la estructura terciaria de la proteína diana, por ejemplo, antitrombina como proteína diana, que eluye con un aumento en la concentración de heparina.

50 El valor de reducción de las proteínas priónicas en la fracción de proteínas que comprende la proteína diana es  $> 1$  a  $4 \lg(10)$ , calculado a partir de la cantidad que se aplicó inicialmente a la resina. El valor analítico de las proteínas priónicas en la fracción de proteínas de interés está por debajo del límite de detección del ensayo de transferencia

Western de priones.

Se divulga que las condiciones cromatográficas comprenden al menos dos de las siguientes etapas:

- i) emplear un tampón de carga y equilibrio que contiene un disolvente y/o un detergente no iónico;
- ii) emplear un tampón de lavado sin disolvente y/o detergente no iónico;
- 5 iii) emplear un tampón de lavado que contiene un alcohol y/o un aminoácido;
- iv) emplear un tampón de lavado que contiene una alta concentración salina;
- v) emplear un tampón de lavado que contiene una baja concentración salina;
- vi) emplear un tampón que contiene una combinación de alcohol y una alta concentración salina.

También se divulga que las condiciones cromatográficas comprenden al menos dos de las siguientes etapas:

- 10 i) emplear un tampón de carga y equilibrio que contiene un disolvente y/o un detergente no iónico;
- ii) emplear un primer tampón de lavado que es un tampón sin disolvente ni detergente no iónico;
- iii) emplear un segundo tampón de lavado que contiene un alcohol y un aminoácido;
- iv) emplear un tercer tampón de lavado que contiene una alta concentración salina;
- v) emplear un cuarto tampón de lavado que contiene una baja concentración salina;
- 15 vi) emplear un tampón de elución que contiene una combinación de alcohol y una alta concentración salina.

Los tampones empleados son los siguientes:

- i) tampón de carga y equilibrio que contiene tri-n-butilfosfato y/o Triton X-100 en una concentración que varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10% (en p/p);
- 20 ii) el segundo tampón de lavado contiene etilenglicol y/o lisina/arginina que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 30% (en p/p) de etilenglicol y de 0,2 a aproximadamente 1,5 M de lisina/arginina;
- iii) el tercer tampón de lavado contiene cloruro de sodio en una concentración que varía de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4 M, en particular de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 M;
- iv) el cuarto tampón de lavado contiene cloruro de sodio en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,2, en particular de 0,01 a aproximadamente 0,1 M;
- 25 v) el tampón de elución contiene etilenglicol y/o cloruro de sodio que tiene una concentración que varía de aproximadamente 25 a aproximadamente 75% (en p/p), en particular de aproximadamente 25 a aproximadamente 50% de etilenglicol y de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4 M de NaCl.

En otra realización de la presente invención, las condiciones cromatográficas comprenden al menos dos de las siguientes etapas:

- 30 i) tampón de carga y equilibrio que contiene tri-n-butilfosfato y/o Triton X-100 en una concentración que varía del 0,3-5% (en p/p);
- ii) lavado con >10 volúmenes de columna de un segundo tampón de lavado que contiene etilenglicol y/o lisina/arginina que varía del 10-25% (en p/p) de EG y lisina/arginina 0,3-1,0 M;
- iii) lavado con >10 volúmenes de columna de un tercer tampón de lavado que contiene cloruro de sodio en una  
35 concentración que varía de 0,8-1,5 M;
- iv) lavado con >10 volúmenes de columna de un cuarto tampón de lavado que contiene cloruro de sodio en una concentración que varía de 0,03-0,15 M;
- v) el tampón de elución contiene etilenglicol y/o cloruro de sodio que tiene una concentración que varía del 35-65% (en p/p) para EG y 0,8-3,0 de NaCl.

- 40 En otra realización de la invención, los tampones empleados son los siguientes:

i) tampón de carga y equilibrio que contiene tri-n-butilfosfato y/o Triton X-100 en una concentración que varía del 0,8-1,2% (en p/p);

ii) lavado con >20 volúmenes de columna de un segundo tampón de lavado que contiene etilenglicol y/o lisina/arginina que varía del 18-22% (en p/p de EG y lisina/arginina 0,4-0,6 M);

5 iii) lavado con >20 volúmenes de columna de un tercer tampón de lavado que contiene cloruro de sodio en una concentración que varía de 0,8-1,2 M;

iv) lavado con >20 volúmenes de columna de un cuarto tampón de lavado que contiene cloruro de sodio en una concentración que varía de 0,08-0,12 M;

10 v) el tampón de elución contiene etilenglicol y/o cloruro de sodio que tiene una concentración que varía del 45-55% (en p/p) para EG y 1,3-1,7 de NaCl.

15 La ventaja de aplicar tampones de lavado de diferentes tipos es que esto aumenta la posibilidad de eliminar priones de diferentes tipos y que se unen debido a diferentes interacciones con la resina de la proteína diana. Además, si se aumenta la cantidad del respectivo tampón de lavado (es decir, un volumen de columna es igual al volumen de la resina), también puede aumentar la seguridad con respecto a que los priones remanentes "actúen lentamente" en el tampón aplicado.

Según la invención, el material cromatográfico multimodal contiene un ligando de ácido 2-(benzoilamino)butanoico cargado negativamente.

20 También se divulga una fracción con una menor cantidad de proteínas priónicas aislada de una fuente que potencialmente contiene proteínas infecciosas. La fracción contiene proteínas farmacéuticamente aceptables que pueden obtenerse según el procedimiento descrito en la presente.

25 En particular, se reivindican fracciones de proteínas que comprenden proteínas plasmáticas, hormonas peptídicas, factores del crecimiento, citoquinas y proteínas de inmunoglobulinas policlonales, proteínas plasmáticas seleccionadas de factores de la coagulación de la sangre humanos y animales, que incluyen fibrinógeno, protrombina, trombina, complejo de protrombina, FX, FXa, FIX, FIXa, FVII, FVIIa, FXI, FXIa, FXII, FXIIa, FXIII y FXIIIa, factor de von Willebrandt, proteínas de transporte, que incluyen albúmina, transferrina, ceruloplasmina, haptoglobina, hemoglobulina y hemopexina, inhibidores de proteasas, que incluyen  $\beta$ -antitrombina,  $\alpha$ -antitrombina,  $\alpha$ 2-macroglobulina, inhibidor de CI, inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), cofactor II de heparina, inhibidor de la proteína C (PAI-3), proteína C y proteína S, proteínas inhibidoras de  $\alpha$ -1 esterasa,  $\alpha$ -1 antitripsina, proteínas antiangiogénicas, que incluyen antitrombina latente, proteínas altamente glicosiladas, que incluyen  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida, antiqumotripsina, inhibidor de inter- $\alpha$ -tripsina,  $\alpha$ -2-HS glicoproteína y proteína reactiva a C y otras proteínas, que incluyen glicoproteína rica en histidina, lectina de unión a manano, proteína de unión a C4, fibronectina, GC-globulina, plasminógeno, factores sanguíneos, tales como eritropoyetina, interferón, factores tumorales, tPA,  $\gamma$ CSF.

30 La invención se describe más a fondo mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

## 35 Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Columna y resina

40 Una columna Tricorn (GE Healthcare, Suecia, área de sección transversal: 0,2 cm<sup>2</sup>, diámetro de 0,5 cm) se cargó con resina Capto MMC (GE Healthcare, n.º de catálogo 17-5317-10, lote n.º 308581), altura del lecho de 9 cm, volumen de columna: 1,8 ml.

#### Material de partida

Se empleó como material de partida una mezcla de proteínas recombinantes derivadas de células HEK 293 y que se habían concentrado en una etapa de columna de captura (n.º de lote: eluato BPP 047 SP, 117  $\mu$ g de proteína/ml).

#### 45 *Composiciones de los tampones\**

##### Tampón 1 (tampón de equilibrio con S/D añadido)

NaCl 0,3 M, CaCl<sub>2</sub> 0,01 M (2 x H<sub>2</sub>O), L-histidina 0,01 M, Triton X-100 al 1% en p/p, TNBP al 0,3% en p/p, pH: 7,0  $\pm$  0,1. Conductividad: 29  $\pm$  3 mS/cm<sup>2</sup> a +25 °C

Tampón 2 (tampón de equilibrio sin S/D)

NaCl 0,3 M, CaCl<sub>2</sub> 0,01 M (2 x H<sub>2</sub>O), L-histidina 0,01 M, Tween 80 al 0,02% (en p/p), pH: 6,5 ± 0,1. Conductividad: 31 ± 3 mS/cm<sup>2</sup> a +25 °C

Tampón 3 (lavado 1; lisina y etilenglicol (= EG))

- 5 NaCl 0,3 M, CaCl<sub>2</sub> 0,01 M (2 x H<sub>2</sub>O), L-histidina 0,01 M, Tween 80 al 0,02% (en p/p), monohidrocloruro de L-lisina 0,5 M, etilenglicol al 20% (en p/p) (= EG) pH: 6,5 ± 0,1, Conductividad: 37 ± 3 mS/cm<sup>2</sup> a +25 °C.

Tampón 4 (lavado 2; lavado con alto contenido salino)

NaCl 0,1 M, CaCl<sub>2</sub> 0,05 M (2 x H<sub>2</sub>O), L-histidina 0,05 M, Tween 80 al 0,02% (en p/p), pH: 6,5 ± 0,1. Conductividad: 89 ± 5 mS/cm<sup>2</sup> a +25 °C.

- 10 Tampón 5 (lavado 3; lavado con bajo contenido salino)

NaCl 0,1 M, CaCl<sub>2</sub> 0,01 M (2 x H<sub>2</sub>O), L-histidina 0,01 M, Tween 80 al 0,02% (en p/p), pH: 6,5 ± 0,1. Conductividad: 13 ± 3 mS/cm<sup>2</sup> a +25 °C.

Tampón 6 (tampón de elución)

- 15 NaCl 1,5 M, CaCl<sub>2</sub> 0,02 M (2 x H<sub>2</sub>O), L-histidina 0,02 M, Tween 80 al 0,02% (en p/p), etilenglicol al 50% (en p/p) (EG), pH: 6,5 ± 0,1 (ajustar el pH antes de la adición de EG). Conductividad: 39 ± 3 mS/cm<sup>2</sup> a +25 °C, medida después de la adición de EG.

Tampón 7 (tampón de regeneración)

Hidróxido de sodio 1 M

Para el ajuste del pH:

- 20 HCl 1 M

\*Los tampones se prepararon con relación a 1 kg de agua añadida, en lugar de 1 l como volumen final. Esto tendrá poco impacto sobre las molaridades finales, puesto que los aditivos aumentarán el volumen final ligeramente.

Condiciones cromatográficas:

- 25 Tabla 1 - Resumen de las cantidades aproximadas de tampón aplicado; los caudales se expresan como ml/min, así como cm/hora. El tiempo requerido para cada etapa de tampón y el tiempo de contacto con el gel para la disolución proteínas también se muestra.

Ensayo de Capto MMC						
Volumen de columna = 18 ml						
Bloque	n.º CV	ml	Flujo ml/min	Flujo cm/h	Tiempo (min)	Tiempo de contacto (min)
Tampón de equilibrio + SD	5	9	1,00	306	9	1,8
Muestra introducida	27	48	1,00	306	48	1,8
Equilibrio - SD	10	18	1,00	306	18	1,8
Lavado de lisina + EG	20	35	0,60	183	59	2,9
Lavado de alto contenido salino	10	18	1,00	306	18	1,8
Lavado de bajo contenido salino (flujo de inicio)	5	9	1,00	306	9	1,8
Tampón de elución, NaCl 1,5 M	7	12	0,20	61	62	8,8

Resina MMC, cargada en una columna Tricorn con una altura del lecho de aproximadamente 9 cm. La etapa de cromatografía se controló para la conductividad y a 280 nm. La carga de proteína fue de aproximadamente 3 mg con relación a 1 ml de resina.

5 En primer lugar, la columna se equilibró de modo apropiado con tampón de equilibrio que contenía productos químicos S/D hasta que se obtuvo una línea de base estable. Al material de partida se le añadieron productos químicos S/D a una proporción de 14 g de disolución madre de S/D por kg para obtener la misma concentración que el tampón de equilibrio, y esto se agitó durante al menos 10 minutos antes de la aplicación de la disolución de proteínas a la columna. Las fracciones de los siguientes tampones se recogieron y se analizaron para las proteínas totales (y los priones en los experimentos de sembrado de PrP<sup>Sc</sup>). El perfil de la cromatografía medida a una absorbancia de 280 nm puede verse en el apéndice 2:

- Corriente (tampón 1 + proteínas)
- Tampón 1 (tampón con alto contenido en detergente no iónico; NaCl 0,3 M, CaCl<sub>2</sub> 0,01 M, L-histidina 0,01 M, Triton X-100 al 1% en p/p, TNBP al 0,3% en p/p, pH: 7,0)
- 15 • Tampón 2 (tampón con bajo contenido en detergente no iónico; NaCl 0,3 M, CaCl<sub>2</sub> 0,01 M, L-histidina 0,01 M, Tween 80 al 0,02% (en p/p), pH 6,5)
- Tampón 3 (tampón de aminoácidos/alcohol; NaCl 0,3 M, CaCl<sub>2</sub> 0,01 M, L-histidina 0,01 M, Tween 80 al 0,02% (en p/p), monohidrocloreuro de L-lisina 0,5 M, etilenglicol al 20% (en p/p), pH 6,5)
- Tampón 4 (tampón con alto contenido salino; NaCl 1,0 M, CaCl<sub>2</sub> 0,05 M, L-histidina 0,05 M, Tween 80 al 0,02% (en p/p), pH: 6,5)
- 20 • Tampón 5 (tampón con bajo contenido salino; NaCl 0,1 M, CaCl<sub>2</sub> 0,01 M, L-histidina 0,01 M, Tween 80 al 0,02% (en p/p), pH: 6,5)
- Tampón 6 (tampón con alto contenido salino/alto contenido en alcohol; NaCl 1,5 M, CaCl<sub>2</sub> 0,02 M, L-histidina 0,02 M, Tween 80 al 0,02% (en p/p), etilenglicol al 50% (en p/p) (EG), pH: 6,5)
- Tampón 7 (tampón de regeneración; NaCl 2 M)

25 La columna se regeneró con 20 volúmenes de columna de NaOH 1 M y se conservó en etanol al 20% (en v/v) para su uso posterior.

**Resultados**

Tabla 2 - Detección de las proteínas totales en el experimento sin priones

Muestra	Volumen de muestra (ml)	Proteínas totales (ug/ml)	Proteínas totales (mg)	Proteínas totales (%)
Material de partida (muestra de carga)	47	117	5,5	100
Corriente (tampón 1)	40	na	na	na
Tampón 2	20	na	na	na
Tampón 3	40	17,9	0,7	13%
Tampón 4	20	10,7	0,2	4%
Tampón 5	10	13,6	0,1	2%
Tampón 6	9	150	1,4	25%
Tampón 7	18	na	na	na
na = no analizado debido a la interferencia del tampón con el procedimiento analítico de las proteínas totales				

30 **Ejemplo 2 (experimento de siembra de priones)**

Para poder determinar la eliminación de proteínas priónicas del procedimiento cromatográfico descrito en el ejemplo 1 se realizó un experimento de sembrado de priones. Se empleó la misma columna, resina, tampones y material de partida que en el ejemplo 1.

Material de partida para la infectividad de proteínas priónicas

5 En este experimento se empleó una fracción microsómica/citosólica de la cepa 263K de scrapie adaptado a hámster.

10 Se descongelaron aproximadamente 54 g del material de partida de proteínas (el mismo que en el ejemplo 1; n.º de lote: eluato BPP 047 SP) que contenía 117 ug/ml de proteínas, en un baño de agua a 25 °C y se calentó hasta la temperatura de 24,0 °C (diana: 20-25 °C). Después se pesaron 51,12 g (diana: 50 ± 2 g) del material de partida y se sembró con 2,6 ml (diana: 2,5 ± 0,2 ml) de la fracción microsómica/citosólica hasta una concentración final del 5,1%. Se comprobó que el pH del material de partida sembrado era de 6,994 (diana: 7,0 ± 0,1). Después se retiró una parte alícuota de 6 ml, se formaron partes alícuotas y se conservaron a ≤ -60 °C (muestra de material de partida sembrado - SSM).

15 Se mezclaron 1,955 g de Triton X-100 con 0,582 g de TnBP (proporción diana: 10 partes + 3 partes, determinación en peso) y se agitaron durante 36 min. Después se añadieron inmediatamente 0,665 g del reactivo S/D al resto de los 47,72 g del material de partida sembrado (proporción diana: 14 g de reactivo S/D por kg de material de partida sembrado) y se agitó durante 31 min. Se comprobó que la temperatura del material de partida era de 24,5 °C al comienzo y de 23,7 °C al final de la fase de agitación (intervalo diana: 18-25 °C).

Etapas de cromatografía

20 Una columna GE Healthcare Tricorn de 1,8 ml cargada con resina Capto MMC (CV = 1,0 ml, altura del lecho = 9 cm) se equilibró con 8,3 CV de tampón 1 (tampón de equilibrio con S/D) a un caudal de 1,0 ml/min (diana: 5 CV a 1,0 ml/min). Después se cargaron 47,29 g del material de partida sembrado tratado con S/D en la columna, aplicando un caudal de 1,0 ml/min (diana: 45 ± 2 g a 1,0 ml/min). Después de la carga, la columna se enjuagó con 10,0 CV de tampón 2 (tampón de equilibrio sin S/D) a un caudal de 0,8 ml/min (diana: 10 CV a 1,0 ml/min). La recolección de la corriente comenzó cuando la señal de UV comenzó a aumentar y continuó hasta que la absorbancia comenzó a disminuir. Se determinó el peso de la fracción de corriente (peso real: 48,23 g), se retiró una parte alícuota de 16 ml, se formaron partes alícuotas y se conservaron a ≤ -60 °C (muestra de corriente - FT). Se recogió la fracción de lavado 1 durante el enjuagado con el tampón 2. Se determinó que el peso real de esta fracción era de 12,75 g, se retiró una parte alícuota de 12 ml y se conservó a ≤ -60 °C (muestra de lavado 1 - W1).

30 La columna después se lavó con 22,2 CV de tampón 3 (lavado de lisina y etilenglicol) a un caudal de 0,6 ml/min (diana: 20 CV a 0,6 ml/min). Durante el lavado con el tampón 3, la fracción de lavado 2 se recogió y se determinó que el peso real de esta fracción era de 40,35 g. Se retiró una parte alícuota de 16 ml y se conservó a ≤ -60 °C (muestra de lavado 2 - W2).

35 Durante el lavado de la columna con 10,0 CV de tampón 4 (lavado de alto contenido salino) a un caudal de 0,9 ml/min (diana: 10 CV a 1,0 ml/min), se recogió la fracción de lavado 3. Se determinó un peso real de 18,48 g, después se retiró una parte alícuota de 16 ml, se formaron partes alícuotas y se conservaron a ≤ -60 °C (muestra de lavado 3 - W3).

40 Durante el lavado de la columna con 5,0 CV del tampón 5 (lavado de bajo contenido salino) a un caudal de 1,0 ml/min (diana: 5 CV a 1 ml/min), se recogió la fracción de lavado 4. Se determinó que el peso real de esta fracción era de 12,22 g. Se retiró una parte alícuota de 11,5 ml y se conservó a ≤ -60 °C (muestra de lavado 4 - W4).

El producto después se eluyó con 8,3 CV del tampón 6 (tampón de elución), aplicando un caudal de 0,2 ml/min (diana: 7 CV a 0,2 ml/min). La recolección del eluato se realizó durante el periodo completo de enjuagado de la columna con tampón 6. Se determinó que el peso real de esta fracción era de 13,54 g, se retiró una parte alícuota de 12,5 ml y se conservó a ≤ -60 °C (muestra de eluato - E).

45 Durante la regeneración de la columna con 9,4 CV del tampón 7 (tampón de regeneración) a un caudal de 0,6 ml/min (diana: 20 CV a 0,6 ml/min), se recogió la fracción de regeneración. Se determinó un peso real de 17,97 ml, después se retiró una parte alícuota de 16 ml y se conservó a ≤ -60 °C (muestra de regeneración - Reg).

Tabla 3 - Resultado del experimento de sembrado de priones

Muestra	Volumen de la muestra (ml)	Contenido en PrP <sup>SC</sup> (log 10)	Contenido en PrP <sup>SC</sup> (%)
---------	----------------------------	---	------------------------------------

Material de partida (muestra - SSM)	54	4,67	100
Flujo, tampón 1 (muestra - FT)	48	4,68	102
Tampón 2 (muestra - W1)	13	3,61	9,5
Tampón 3 (muestra - W2)	40	2,61	0,9
Tampón 4 (muestra - W3)	18	<1,27	<0,04
Tampón 5 (muestra - W4)	12	<1,09	<0,03
Tampón 6 (muestra - E)	14	<1,13	<0,03
Tampón 7	18		
Muestra - Reg		<1,26	<0,4

### Análisis

5 Tal como puede observarse en la tabla 3 y el apéndice 1 (figura 1-5), pueden verse unos excelentes valores de eliminación de proteínas priónicas para las fracciones del tampón 4-7. Así, los productos de proteínas, que eluyen dentro de estas fracciones, presentarían unos márgenes de seguridad muy buenos con respecto a la eliminación de PrP<sup>Sc</sup>. También es muy importante que el equilibrio de masas de la proteína priónica aplicada indica no se encuentran PrP<sup>Sc</sup> en absoluto en otras fracciones distintas a la corriente y en el tampón de lavado temprano. Por lo que saben los inventores, esto no ha sido demostrado previamente en la técnica anterior. En los ejemplos publicados de resinas de cromatografía como etapa de eliminación de proteínas priónicas, incluso si se logran 10 unos valores de reducción de proteínas priónicas relativamente aceptables normalmente pueden encontrarse proteínas priónicas en varias fracciones, tanto antes como después de ocuparse de la fracción del producto, lo cual indica un riesgo de contaminación cruzada.

### Descripción del análisis

#### Determinación de las proteínas totales según Bradford

15 La determinación de las proteínas según Bradford se basa en la observación de que la absorbancia máxima para una disolución ácida de azul brillante de Coomassie G-250 se desplaza de 465 nm a 595 nm cuando se produce la unión a las proteínas. Las interacciones hidrófobas e iónicas estabilizan la forma aniónica del tinte, provocando un cambio de color visible. El ensayo es útil puesto que el coeficiente de extinción de una disolución del complejo de tinte-albúmina se mantiene constante a lo largo de un intervalo de concentración en 10 veces.

20 Para más información, véase también Bradford, M.M., A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72:248-254, 1976.

#### *Ensayo de la transferencia Western para la detección de PrP<sup>Sc</sup>*

El ensayo de la transferencia Western es una determinación semicuantitativa de la proteína priónica (PrP<sup>Sc</sup>) asociada al scrapie resistente a la proteínasa K.

25 El ensayo de la transferencia Western se realiza según se describe en D.C. Lee *et al.*, Journal of Virological Methods, 2000, 84:77-89.

**REIVINDICACIONES**

1.- Un procedimiento de aislamiento y purificación de una proteína diana mediante una cromatografía, en el que la cromatografía elimina o disminuye la cantidad de priones (PrP<sup>SC</sup>), que comprende las etapas de:

5 - poner en contacto una muestra potencialmente contaminada con PrP<sup>SC</sup> que comprende una proteína diana, con un material cromatográfico multimodal, en el que el material cromatográfico multimodal contiene un ligando de ácido 2-(benzoilamino)butanoico cargado negativamente;

- establecer las condiciones del tampón de modo que la proteína diana se una al material cromatográfico multimodal, mientras que las PrP<sup>SC</sup> no se unan al material cromatográfico multimodal, en el que las condiciones cromatográficas comprenden las siguientes etapas:

10 i) emplear un tampón de carga y equilibrio que contiene tri-n-butilfosfato y/o Triton X-100 en una concentración que varía del 0,1 al 10% ( p/p);

ii) emplear un tampón de lavado sin disolvente y/o detergente no iónico;

iii) emplear un segundo tampón de lavado que contiene etilenglicol y/o lisina/arginina que varía del 5 al 30% ( p/p) de etilenglicol y de 0,2 a 1,5 M de lisina/arginina;

15 iv) emplear un tercer tampón de lavado que contiene cloruro de sodio en una concentración que varía de 0,5 a 4 M, en particular de 0,5 a 1,5 M;

- seguido de la elución de la proteína diana.

2.- El procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además:

20 v) emplear un cuarto tampón de lavado que contiene cloruro de sodio en una concentración que varía de 0,01 a 0,2, en particular de 0,01 a 0,1 M; o

vi) emplear un tampón que contiene etilenglicol y/o cloruro de sodio que tiene una concentración que varía del 25 al 75% (en p/p), en particular del 25 al 50% de etilenglicol y de 0,5 a 4 M de NaCl .

3.- El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la proteína diana se eluye después de la elución de los priones por medio de:

25 - un cambio en la fuerza iónica del tampón de elución mediante el aumento o la disminución de la fuerza iónica,

- la adición de alcoholes al tampón de elución (en particular en disolución acuosa), tales como mono- o dihidroxialcanoles, por ejemplo, alcoholes alifáticos inferiores, tales como metanol, etanol, propanol, y/o

- un cambio en el valor del pH del tampón de elución mediante el aumento o la disminución del pH.

30 4.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el valor de eliminación de las proteínas priónicas en la fracción de proteínas que comprende la proteína diana es  $> 1$  a  $4 \lg(10)$ , calculado a partir de la cantidad que se aplicó inicialmente a la resina.

5.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el valor analítico de las proteínas priónicas en la fracción de proteínas de interés está por debajo del límite de detección del ensayo de transferencia Western de priones.

35