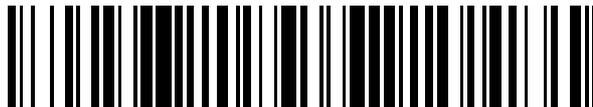


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 408**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2011 PCT/CN2011/001374**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12083580**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2011 E 11852039 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2655396**

54 Título: **Método para purificar albúmina sérica humana a partir de grano de arroz transgénico**

30 Prioridad:

24.12.2010 CN 201010606635

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

20.12.2016

73 Titular/es:

**WUHAN HEALTHGEN BIOTECHNOLOGY CORP.
(100.0%)**

**No.666 Gaoxin Avenue, East Lake, High-Tech
Development Zone
Wuhan, Hubei 430079, CN**

72 Inventor/es:

**YANG, DAICHANG;
HE, YANG;
LI, GUANGFEI y
LIU, JINGRU**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 594 408 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para purificar albúmina sérica humana a partir de grano de arroz transgénico.

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología, y más particularmente a un método para aislar y purificar albúmina sérica humana recombinante (rHSA) a partir de grano de arroz transgénico a gran escala.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La albúmina sérica humana (HSA) es una proteína no glicosilada de cadena sencilla que consiste en 585 aminoácidos, que tienen un peso molecular de 66,5 kD y un punto isoeléctrico entre 4,7-4,9. Es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo humano, constituyendo aproximadamente el 60 % de las proteínas plasmáticas totales. Hay aproximadamente 40 g de HSA por litro de sangre humana. Además de estar presente en el plasma, la HSA también se encuentra en tejidos y secreciones corporales, pieles y cavidades linfáticas. En condiciones fisiológicas normales, la HSA tiene el efecto de mantener la presión coloidosmótica del plasma, nutrir, acelerar la concrescencia de heridas, y como vehículo, participar en el transporte de muchas moléculas biológicas hidrófobas, tales como hormonas, sustancias biológicas activas y fármacos en la sangre. Por lo tanto, la HSA es una proteína médica importante que se usa principalmente de manera clínica para el tratamiento de la hipoproteinemia causada por la pérdida de sangre, quemaduras, escaldaduras, cirugía plástica y lesión cerebral, así como para el tratamiento de la cirrosis hepática, la hidronefrosis, etc.

En la actualidad, la HSA para el uso clínico se prepara principalmente mediante la extracción y el aislamiento de plasma humano. Sin embargo, este planteamiento de preparación tiene las siguientes desventajas: por un lado, la fuente de plasma es insuficiente, es decir el suministro de sangre limitado es incapaz de satisfacer las demandas de producción de HSA y las preparaciones relevantes de la misma; por otro lado, la propia sangre puede ser potencialmente un factor de riesgo, por ejemplo puede contener patógenos infecciosos peligrosos como el virus de la hepatitis, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), etc., lo que causa enormemente preocupaciones acerca de la aplicación de HSA extraída de plasma. Por lo tanto, es urgente desarrollar un proceso alternativo para producir HSA.

Con el desarrollo de técnicas modernas de ADN recombinante y de síntesis, los investigadores toman un profundo interés en la producción y la aplicación de albúmina sérica humana recombinante (rHSA). Hasta ahora, se han estado usando experimentalmente diversos sistemas de expresión para la producción en masa de rHSA. Por ejemplo, procariotas como el colibacilo (Latta, M. y col., *Bio/Technology*, 5: 1309-1314, (1987)), el bacillus subtilis (Saunders, C. W. y col., *J. Bacteriol.* 169: 2917-2925, (1987)), eucariotas tales como levaduras (documentos WO 00/44772, EP0683233A2, US 5612196) y también se ha usado el cultivo de células animales para la producción de rHSA. Sin embargo, tales planteamientos anteriores no son adecuados para la producción industrializada debido al bajo nivel de expresión o bien al alto coste de producción.

La solicitud de patente china n.º 200510019084.4 de los presentes inventores desvela un procedimiento para producir rHSA usando células del endospermo del arroz como biorreactor, que comprende: usar promotores y péptidos señal expresados específicamente en el endospermo del arroz para mediar la entrada de rHSA en el sistema de endomembranas de las células del endospermo del arroz y almacenar la rHSA en los cuerpos proteicos del endospermo del arroz, permitiendo de ese modo que se acumule rHSA extensamente en el grano de arroz y alcance un mayor nivel de expresión finalmente. El nivel de expresión de la rHSA obtenida es al menos superior al 0,3 % en base al peso del grano de arroz. El procedimiento tiene las ventajas del alto nivel de expresión y el bajo coste, por lo que proporciona la posibilidad de desarrollar una estrategia novedosa para la producción de fármacos proteicos.

La rHSA producida mediante cualquier sistema de expresión debe purificarse antes de introducirse en el mercado. La técnica de purificación puede afectar a la calidad del producto, así como al coste de producción. El coste del proceso de purificación constituye aproximadamente el 80-90 % del coste de producción total. En la actualidad, no existe ningún proceso de purificación para separar y purificar la rHSA del grano de arroz. Por lo tanto, es técnicamente difícil y arriesgado económicamente desarrollar un proceso de purificación sencillo y rentable para purificar la rHSA del grano de arroz.

El documento US 2008/0274501 describe un método para la purificación de proteínas ácidas expresadas en células de tabaco por interacción hidrófoba y cromatografía de hidroxapatita cerámica, y el documento US 2008/0274501 desvela la purificación de beta-glucuronidasa recombinante (rGUS). El documento WO 2004/099405 describe la expresión y purificación de proteínas sanguíneas y desvela cómo expresar proteína recombinante en grano de arroz y la extracción de proteínas y la concentración por diafiltración.

En la actualidad, se han indicado técnicas para extraer rHSA de levadura y células de suspensión vegetales. Por ejemplo, la solicitud de patente China CN101768206A desveló un proceso para purificar rHSA expresada en *Pichia pastoris*, que comprende: filtrar el caldo de fermentación de rHSA con una membrana cerámica, y posteriormente someter el filtrado a cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía hidrófoba y cromatografía de intercambio aniónico débil para obtener rHSA purificada. Sin embargo, debido a las diferencias sustanciales de las impurezas entre el grano de arroz, la levadura y las células de suspensión vegetales, esta técnica anterior no puede usarse directamente para separar y purificar la rHSA del grano de arroz. Por lo tanto, es deseable desarrollar un proceso sencillo y eficaz para separar y purificar rHSA del grano de arroz para producir rHSA con un alto rendimiento y alta pureza, lo que proporcionará una base para una futura producción industrializada.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

El objeto de la presente invención es proporcionar un método para separar y purificar albúmina sérica humana recombinante (rHSA) a partir de grano de arroz a gran escala.

Para conseguir el objeto anterior, la presente invención proporciona la siguiente solución técnica: Un método para separar y purificar albúmina sérica humana recombinante a partir de grano de arroz, que comprende secuencialmente las etapas de:

- 1) someter el extracto en bruto de albúmina sérica humana recombinante a cromatografía de intercambio catiónico para obtener el producto primario I;
- 2) someter el producto primario I a cromatografía de intercambio aniónico para obtener el producto secundario II;
- 3) someter el producto secundario II a cromatografía hidrófoba para obtener albúmina sérica humana recombinante purificada;

donde el método comprende adicionalmente una etapa de someter el producto secundario II a cromatografía de hidroxapatita cerámica antes de la cromatografía hidrófoba de la etapa 3).

En la etapa 1), la cromatografía de intercambio catiónico puede realizarse en una resina de cromatografía catiónica fuerte como medio de cromatografía, que se selecciona del grupo que consiste en UNO Sphere S, Nuvia S, Capto MMC, MacroPrep-CM. Se prefiere UNO Sphere S o Capto MMC.

La cromatografía de intercambio catiónico puede emplear una elución en gradiente de pH o una elución en gradiente de concentración de NaCl. Se prefiere la elución en gradiente de pH.

En una realización, el tampón de elución para la cromatografía de intercambio catiónico comprende un tampón acetato, cloruro sódico 0,25 M, con un pH de 5,2.

En la etapa 2), la cromatografía de intercambio aniónico puede realizarse sobre una resina de cromatografía aniónica fuerte como medio cromatográfico, que se selecciona del grupo que consiste en UNOsphere Q, Q Sepharose FF y DEAE sepharose FF. Se prefiere Q Sepharose FF.

En una realización, el tampón de elución para la cromatografía de intercambio aniónico comprende un tampón fosfato, cloruro sódico 0,2 M, con un pH de 7,5.

En la etapa 3), la cromatografía hidrófoba puede realizarse en un medio cromatográfico seleccionado del grupo que consiste en Fenil sepharose HP, Fenil sepharose FF, macro-prep t-butilo y macro-prep metilo. Se prefiere Fenil sepharose HP.

El eluato que comprende la proteína diana de la columna de cromatografía hidrófoba puede prepararse en un producto finalizado mediante técnicas conocidas, tal como concentración por ultra-filtración y liofilización.

Adicionalmente, el método puede comprender una etapa de someter el producto secundario II a cromatografía de

hidroxiapatita cerámica Macro-prep antes de la cromatografía hidrófoba de dicha etapa 3). Es decir, en tal realización, el producto secundario que contiene la proteína diana se somete a cromatografía de hidroxiapatita cerámica Macro-prep como la etapa 3) y después cromatografía hidrófoba para obtener la proteína diana purificada como la etapa 4).

5

La cromatografía de hidroxiapatita cerámica puede realizarse en un medio cromatográfico seleccionado del grupo que consiste en hidroxiapatita cerámica de Tipo I Macro-prep e hidroxiapatita cerámica de Tipo II Macro-prep. Se prefiere hidroxiapatita cerámica de Tipo I Macro-prep.

10 En una realización, el tampón de carga empleado en la cromatografía de intercambio catiónico comprende un tampón acetato, con un pH por debajo de 5,0; y el tampón de elución para eluir la proteína diana empleada en la cromatografía de intercambio catiónico puede comprender un tampón acetato y cloruro sódico, o un tampón fosfato y cloruro sódico, con un pH de 5,0~6,7. Preferiblemente, la concentración de cloruro sódico es 0,25 M y el pH del tampón de elución es 5,2.

15

En una realización, la cromatografía de intercambio catiónico se realiza en UNO Sphere S o Capto MMC, y se emplea el tampón de elución que comprende un tampón acetato, cloruro sódico 0,25 M, con un pH de 5,2 o 6,7.

20 En una realización, la cromatografía de intercambio catiónico se realiza en nuvia S como medio cromatográfico, y se emplea un tampón de elución que comprende un tampón acetato, cloruro sódico 0,25 M, con un pH de 5,0 o 5,2.

25 En una realización, la cromatografía de intercambio catiónico se realiza en Capto MMC como medio cromatográfico, y se emplea un tampón de lavado que comprende un tampón acetato, cloruro sódico 1 M, con un pH de 4,7 para eliminar las impurezas; y se emplea un tampón de elución que comprende un tampón fosfato, cloruro sódico 1 M, con un pH de 6,7 para eluir la proteína diana.

30 En una realización, la cromatografía de intercambio catiónico se realiza en MacroPrep-CM como medio cromatográfico, y se emplea un tampón de lavado que comprende un tampón acetato, cloruro sódico 1 M, con un pH de 4,7 para eliminar las impurezas; y se emplea un tampón de elución que comprende un tampón fosfato, cloruro sódico 0,1 M, con un pH de 6,5 para eluir la proteína diana.

35 En una realización, la cromatografía de intercambio aniónico se realiza en Q Sepharose FF como medio cromatográfico, y se emplea un tampón de elución que comprende un tampón fosfato, cloruro sódico 0,25 M con un pH de 6,0~7,0.

40 En una realización, la cromatografía de intercambio aniónico se realiza en DEAE sepharose FF como medio cromatográfico, y se emplea un tampón de lavado que comprende un tampón fosfato, cloruro sódico 0,1 M con un pH de 6,0~7,0 para eliminar las impurezas; y se emplea un tampón de elución que comprende un tampón fosfato, cloruro sódico 0,25 M con un pH de 6,0~7,0 para eluir la proteína diana.

45 En una realización, la fracción que contiene rHSA a purificar por cromatografía hidrófoba puede comprender adicionalmente sulfato de amoníaco. La concentración de sulfato de amoníaco puede ser de 0,1 M a 1 M.

50 En una realización, la cromatografía hidrófoba se realiza en Fenil sepharose HP como medio cromatográfico, y la concentración de sulfato de amoníaco en la fracción que contiene rHSA a purificar es 0,4 M.

En una realización, la cromatografía hidrófoba se realiza en Fenil sepharose FF como medio cromatográfico, y la concentración de sulfato de amoníaco en la fracción que contiene rHSA a purificar es 0,1 M.

55 En una realización, la cromatografía hidrófoba se realiza en MacroPrep-t-Butilo como medio cromatográfico, y la concentración de sulfato de amoníaco en la fracción que contiene rHSA a purificar es de 0,6 M a 1,0 M.

En una realización, la cromatografía de hidroxiapatita cerámica Macro-prep emplea un tampón de elución que comprende un tampón fosfato con un pH de 7,0~7,5 para eluir la proteína diana.

55

Dicha rHSA de la presente invención puede prepararse usando células de endospermo de arroz como biorreactor, que se desvela en la solicitud de patente China n.º 200510019084.4, presentada por el presente Solicitante. La rHSA expresada en el arroz transgénico puede extraerse mediante el método desvelado en la solicitud de patente China n.º 201010597544.2, presentada por el presente Solicitante, que comprende preferiblemente las etapas de:

- i) mezclar arroz transgénico molido que contiene rHSA con un tampón de extracción en una relación p/v (kg/l) de 1:5, seguido de la extracción durante 1~1,5 horas a 55~60 °C para obtener una mezcla I; el tampón de extracción comprende un tampón fosfato 10~30 mM, acetato sódico 10~20 mM, sulfato de amoníaco 15~30 mM y caprilato sódico 5~20 mM, con un pH de 6,5~8;
- 5 ii) ajustar el pH de la mezcla I de la etapa i) a 4,0~4,5 y precipitándola durante 3~12 horas para obtener la mezcla II;
- iii) filtrar la mezcla II de la etapa ii) para eliminar los almidones o proteínas no diana, y después recoger el filtrado para obtener un extracto en bruto que contiene una alta concentración de rHSA.
- 10 En una realización, dicha filtración comprende las etapas de filtrar por filtración a presión con un filtro prensa de placas y marcos de tipo tela filtrante, después filtrar por microfiltración con una membrana de fibras huecas de polietersulfona. La membrana de fibras huecas tiene un tamaño de poro de 0,20 µm~0,45 µm, preferiblemente 0,22 µm.
- 15 Las soluciones técnicas de acuerdo con la presente invención tienen las siguientes ventajas:
1. Con respecto a un contenido relativamente alto de pigmentos y polisacáridos en el grano de arroz, se usa cromatografía de intercambio catiónico como la primera etapa en la presente invención para mejorar de forma eficaz la capacidad de carga para capturar o unirse a rHSA, que aumenta la eficiencia cromatográfica. Por el contrario, si se usa cromatografía de intercambio aniónico como la primera etapa, la capacidad de carga para capturar rHSA es únicamente aproximadamente el 20 % de la capacidad teórica. Mientras tanto, tanto UNO Sphere S como Cpto-MMC tienen caracteres de excelente estabilidad y una larga vida útil en hidróxido sódico, lo que alarga el periodo de depreciación del medio cromatográfico y simplifica la operación de higienización en la presente invención, y finalmente reduce el coste del producto diana.
 - 20 2. Se usa cromatografía de intercambio aniónico como la segunda etapa en la presente invención. Después de optimizar las condiciones de elución, puede eliminarse por encima del 80 % de las proteínas no diana en el grano de arroz, eliminando así de forma eficaz las proteínas no diana y recuperando la rHSA. Dado que los pigmentos y polisacáridos se han eliminado del grano de arroz en la primera etapa por cromatografía de intercambio catiónico, su influencia sobre la capacidad de carga y la eficiencia de la purificación en la cromatografía de intercambio aniónico se ha eliminado.
 3. Se usa cromatografía de hidroxapatita cerámica Macro-prep como la tercera etapa en la presente invención para eliminar el dímero y los polímeros debido a que muchos de los dímeros o polímeros pueden causar alergia al usar rHSA como medicina de inyección. Esta etapa mejora notablemente la pureza, lo que satisface el requisito de alta pureza para aplicación clínica o más.
 - 35 4. Se usa cromatografía hidrófoba como la etapa final en la presente invención. Después del procedimiento cromatográfico de tres etapas, la pureza de HPLC del producto diana puede alcanzar aproximadamente el 99,0 %.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 40 La figura 1 es una imagen de SDS-PAGE de fracciones obtenidas a partir de cromatografía de intercambio catiónico realizada en diferentes medios cromatográficos como purificación primaria, donde A: medio UNOsphere S, B: medio Nuvia S, C: medio Cpto MMC y D: medio MacroPrep-CM.
- La figura 2 muestra un diagrama comparativo de la capacidad de carga (volumen) para el extracto de rHSA entre medio Nuvia S y medio UNO Sphere S a diferente caudal (300 cm/h, 600 cm/h).
- 45 La figura 3 es una imagen de SDS-PAGE de fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico realizada en diferentes medios cromatográficos como purificación primaria, donde A: medio UNO Sphere Q, B: medio Q Sepharose FF.
- La figura 4 es un gráfico de cambio que muestra la capacidad de carga para el extracto de rHSA del medio Q Sepharose FF y el contenido de polisacáridos en el extracto de rHSA antes o después de la diálisis.
- 50 La figura 5 es una imagen de SDS-PAGE de fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico realizada en diferentes medios cromatográficos como purificación secundaria, donde A: medio Q Sepharose FF, B: medio DEAE sepharose FF.
- La figura 6 es una imagen de SDS-PAGE de fracciones obtenidas por cromatografía hidrófoba realizada en diferentes medios cromatográficos como purificación final, donde A: medio Fenil Sepharose HP, B: medio Fenil Sepharose FF, C: medio Macro Prep-t-Butilo.
- 55 La figura 7 es una imagen de SDS-PAGE de fracciones de eluato obtenidas sometiendo secuencialmente extracto de rHSA en bruto a cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía hidrófoba, realizadas en UNOsphere S(A), Q Sepharose FF(B) y Fenil Sepharose HP(C) como medio cromatográfico, respectivamente.

La figura 8 es un cromatograma de HPLC del producto de rHSA purificada (HPLC-SEC) obtenido de acuerdo con una realización de la presente invención.

La figura 9 es una imagen de SDS-PAGE de fracciones de eluato obtenidas realizando cromatografía de hidroxapatita cerámica en medio de hidroxapatita cerámica de Tipo I Macro-prep.

5 La figura 10 es un cromatograma de HPLC del producto de rHSA purificada obtenido de acuerdo con otra realización de la presente invención.

La figura 11 es una imagen de SDS-PAGE de fracciones de eluato obtenidas realizando secuencialmente cromatografía de hidroxapatita cerámica en medio de hidroxapatita cerámica de Tipo II Macro-prep y cromatografía hidrófoba en medio Fenil Sepharose HP.

10 La figura 12 es un cromatograma de HPLC del producto de rHSA purificada obtenido de acuerdo con otra realización de la presente invención.

En las figuras anteriores, S: muestra de carga, FT: fluido de transmisión, Elu: el eluato que contiene rHSA, Elu 1: eluato de proteína no diana, Elu 2: eluato de rHSA, CIP: fracción de limpieza *in situ*.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las características y ventajas de la presente invención se pueden entender más aún por los siguientes ejemplos. Los ejemplos son sólo ilustrativos y no deberían interpretarse como que limitantes de la invención de ningún modo.

20

Selección del medio cromatográfico y condiciones de elución en cromatografía de intercambio catiónico

La presente invención define el medio cromatográfico de una resina de intercambio catiónico como poseedor de un alto caudal de trabajo, incluyendo UNO Sphere S, Nuvia S, Capto MMC y etc. fabricado por Bio-RAD.

25

Se descubre mediante experimentos que cada uno de Capto MMC, Nuvia S y UNO Sphere S puede usarse para la purificación de rHSA. Capto MMC tiene el mejor efecto en la purificación de proteínas, seguido de UNO Sphere S y Nuvia S. No hay ninguna diferencia significativa entre los efectos en la purificación de proteínas de Nuvia S y UNO Sphere S. Sin embargo, en las mismas condiciones de caudal de trabajo, la capacidad de carga de UNO Sphere S es 1,5 veces mayor que la de Capto MMC; UNO Sphere S tiene un mismo caudal de trabajo que Capto MMC; UNO Sphere S tiene excelente estabilidad incluso en alta concentración de hidróxido sódico y tiene un mejor proceso de limpieza, una vida útil operativa mayor y mejor coste en comparación con Capto MMC.

30

Nuvia S y UNO Sphere S tienen propiedades similares, pero se diferencian en la extensión de los ligandos y los tamaños de partícula de la matriz. En su caudal operativo óptimo respectivo, la capacidad de carga de Nuvia S es 1,4 veces mayor que la de UNO Sphere S; sin embargo, el caudal de trabajo de Nuvia S es aproximadamente la mitad que el de UNO Sphere S. En su lugar, UNO Sphere S tiene mayor capacidad de carga que Nuvia S al mismo caudal, y ambos tienen una capacidad de purificación casi equivalente.

35

40 En vista de los diversos factores, UNO Sphere S se usa preferiblemente como medio cromatográfico para la cromatografía de intercambio catiónico.

El extracto que contiene rHSA se carga en un relleno de columna UNO Sphere S a un pH relativamente bajo (pH = 4,4) para asegurar que la rHSA puede absorberse completamente en el medio, y después se eluye por tampones de elución en gradiente de pH y tampones de elución en gradiente de NaCl respectivamente para aprender las condiciones de elución básicas.

45

Los resultados sugieren que en la elución en gradiente de pH, la rHSA absorbida en la columna UNO Sphere S se desorbe ligeramente cuando el pH del tampón de elución está por encima de 5,5, indicando que el pH del tampón de carga no debe ser mayor de 5,5; cuando el pH del tampón de elución es 5,68, la rHSA se desorbe completamente de la columna. Por lo tanto, la rHSA en la columna UNO Sphere S es muy sensible a la elución en gradiente de pH.

50

En la elución en gradiente de concentración de NaCl, la proteína diana rHSA se desorbe cuando el gradiente de concentración es cloruro sódico 1 M del 35 % al 60 % (NaCl), indicando así que la rHSA en la columna UNO Sphere S no es sensible a la elución en gradiente de concentración de NaCl. Los resultados demuestran que tanto el gradiente de pH como el gradiente de NaCl pueden usarse para eluir la rHSA. Sin embargo, el gradiente de pH eluye la rHSA con más sensibilidad y menor volumen de tampón de elución. Por el contrario, el gradiente de NaCl no puede eluir fácilmente la rHSA, y requiere una alta concentración de NaCl y un mayor volumen de tampón de elución.

55

Considerando la eficiencia de la purificación y la tasa de recuperación, el tampón de elución preferido es un tampón fosfato (pH 5,2) que contiene NaCl 0,25 M.

5 Selección del medio cromatográfico y condiciones de elución para la cromatografía de intercambio aniónico

Al igual que una resina de intercambio catiónico, también puede usarse una resina de intercambio aniónico para la purificación de rHSA. La presente invención define el medio cromatográfico de una resina de intercambio aniónico como poseedor de un alto caudal y una alta capacidad de carga, que incluye UNOsphere Q, Q Sepharose FF, DEAE sepharose FF y etc.

Se descubre mediante experimentos que cada uno de UNOsphere Q, Q Sepharose FF y DEAE sepharose FF puede usarse para la purificación de rHSA. UNOsphere Q tiene un caudal más rápido que Q Sepharose FF, pero Q Sepharose FF tiene una mejor eficiencia de purificación que UNOsphere Q; mientras que DEAE Sepharose FF tiene una similar eficiencia de purificación, pero un caudal menor en comparación con Q Sepharose FF.

Como se ha descrito anteriormente, como un medio cromatográfico para cromatografía de intercambio catiónico, UNO-sphere S tiene una capacidad de purificación ligeramente más deficiente que Capto MMC. Sin embargo, se demuestra mediante experimentos que este efecto adverso puede eliminarse mediante la mejora de la capacidad de purificación sistemática. UNO-sphere S no causará efectos adversos sobre la posterior cromatografía de intercambio aniónico. En una realización preferida, se usa preferiblemente Q sepharose FF como el medio cromatográfico para la cromatografía de intercambio aniónico y el tampón de elución para eluir la proteína diana comprende un tampón fosfato y NaCl 0,2 M, con un pH de 6,8.

25 Determinación del orden de la cromatografía de intercambio aniónico y catiónico

Puede usarse tanto cromatografía de intercambio aniónico como catiónico como la purificación primaria de rHSA, sin embargo, se descubre mediante experimentos que cuando se usa resina de intercambio aniónico Q Sepharose FF en la etapa de purificación primaria, su capacidad de carga es bastante menor que la capacidad teórica. Esto puede asociarse a los polisacáridos y ácidos nucleicos solubles presentes en gran medida en el grano de arroz. Dado que los polisacáridos y ácidos nucleicos solubles contienen cargas negativas, pueden unirse a Q Sepharose FF para reducir su capacidad de carga. Se demuestra mediante experimentos que el contenido de los polisacáridos solubles en el extracto de rHSA puede reducirse por diálisis, aumentando así la capacidad de carga de Q Sepharose FF.

Por el contrario, el medio de cromatografía de intercambio catiónico, tal como UNO sphere S, Nuvia S y Capto MMC no se une a los polisacáridos o ácidos nucleicos solubles, lo que evita causar un descenso en la capacidad de carga. Por lo tanto, la cromatografía de intercambio catiónico se determina como la purificación primaria y la cromatografía de intercambio aniónico se determina como la purificación secundaria en la presente invención.

40 Selección del medio cromatográfico para cromatografía hidrófoba

La presente invención emplea diversos medios de cromatografía hidrófoba con propiedades similares para la etapa de purificación, incluyendo Fenil sepharose HP, Fenil sepharose FF (LS), macro-prep t-butilo y macro-prep metilo.

Fenil sepharose HP tiene una fuerte propiedad hidrófoba y excelente capacidad de purificación. La capacidad de eliminar la mayor parte de las proteínas no diana y otras impurezas del extracto en bruto es crítica para la eficiencia de la purificación; sin embargo, existen algunos inconvenientes en la aplicación de este medio cromatográfico debido a su fino tamaño de partículas, bajo causal y modo de trabajo especial.

En comparación con Fenil sepharose HP, Fenil sepharose FF (LS) tiene el mismo ligando y matriz, pero diferente diámetro de la matriz esférica y diferente densidad del ligando. El tamaño de partícula medio de la matriz de Fenil sepharose FF (LS) es 3 veces mayor que el de Fenil sepharose HP, y, por lo tanto, el primer o tiene un mayor caudal de trabajo. Al usarse en la producción de rHSA, puede acortar el periodo de producción. MacroPrep-Butilo tiene una hidrofobicidad más débil que tanto Fenil sepharose FF como Fenil sepharose HP, mientras que Macro-prep metilo tiene una hidrofobicidad incluso más débil que MacroPrep-Butilo.

Fenil sepharose FF se realiza de forma experimental en el mismo modo de trabajo que Fenil sepharose HP para recoger el fluido de transmisión. En la selección de la concentración de sal en la muestra de carga, cuando la muestra se carga con un tampón de equilibrio (PB 25 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 M, pH 6,8) y se eluye con agua al 100 %, se eluye con agua al 100 %.

se descubre que más del 50 % de la rHSA se queda en la columna. Como resultado, la concentración de sal del tampón de equilibrio debe reducirse.

Las muestras filtradas por columna UNO sphere S y Q sepharose FF se añaden con sulfato de amoníaco para
5 ajustar la concentración de sulfato de amoníaco a 0,2 M y 0,1 M, respectivamente antes de la carga en una columna Fenil sepharose FF (LS). El fluido de transmisión y el eluato de agua pura se recogen para realizar la detección SDS-PAGE. Los resultados muestran que Fenil sepharose FF (LS) tiene una hidrofobicidad más fuerte que Fenil sepharose HP y tiene mejor efecto para eliminar las proteínas no diana en la muestra incluso cuando la concentración de sulfato de amoníaco en la muestra de carga es tan baja como 0,1 M. El producto obtenido por Fenil
10 sepharose FF (LS) tiene una pureza del 93,5 %. Sin embargo, aún el 30 % de la rHSA se pierde en la columna Fenil sepharose FF (LS). El experimento anterior se realiza usando cloruro sódico en lugar de sulfato de amonio, y se obtienen resultados similares. Aunque la pérdida de rHSA en la columna se reduce, la pureza de HPLC del producto es de aún aproximadamente el 93 %.

15 Las muestras filtradas por columna UNO sphere S y Q sepharose FF se añaden con sulfato de amoníaco para ajustar la concentración de sulfato de amoníaco a 1 M, 0,8 M o 0,6 M respectivamente, antes de la carga en una columna macro-prep t-butilo y macro-prep metilo. El fluido de transmisión y el eluato de agua pura se recogen para realizar una detección SDS-PAGE. Los resultados muestran que macro-prep t-butilo y macro-prep metilo tienen una hidrofobicidad deficiente. Ambos tienen una mala capacidad de purificación en rHSA, y la rHSA obtenida tiene una
20 pureza del 90 % por HPLC.

Para seleccionar la hidroxapatita cerámica Macro-prep de tipo I o tipo II, se compararon dos tipos de hidroxapatita cerámica Macro-prep de Bio Rad. Se descubrió que la hidroxapatita cerámica Macro-prep de tipo I es mucho mejor que la de tipo II. Después de la cromatografía con hidroxapatita cerámica de tipo I Macro-prep, el contenido de
25 monómero puede alcanzar hasta el 98,998 %.

Como se ha descrito anteriormente, aunque el otro medio cromatográfico tiene la ventaja de tener un caudal de trabajo rápido sobre Fenil sepharose HP, pueden no conseguir la eficiencia de purificación comparable con respecto a Fenil sepharose HP. Fenil sepharose HP tiene un caudal de trabajo bajo relativo, pero puede asegurar que la
30 proteína diana tiene una pureza de más del 98 %. Por lo tanto, se usa preferiblemente Fenil sepharose HP como el medio para la cromatografía hidrófoba.

Ejemplos

35 Materiales e instrumentos

Filtro prensa de placas y marcos de tipo tela filtrante, tipo: XMS4/500-UB, fabricado por Shanghai Tianli Filter Press Co., Ltd (China); columna de fibras huecas de 0,20 μm , disponible en Huzhou Kelu Membrane Technology Co., Ltd. (China);

40 Medios UNO Sphere S, nuvia S, Capto MMC, MacroPrep-CM, MacroPrep-metilo, MacroPrep-Butilo, disponibles en BIO-RAD (Estados Unidos);

Medios Q sepharose, Fenil sepharose HP, Fenil sepharose FF, DEAE-sepharose FF, disponibles en GE Healthcare (Estados Unidos);

Cromatografía en columna C10/10, XK16/20, disponible en GE Healthcare (Estados Unidos)

45 Columna cromatográfica biológica 15/200, disponible en BIO-RAD (Estados Unidos)

Ejemplo 1: Extracción de rHSA de grano de arroz transgénico

Puede prepararse arroz transgénico de acuerdo con el método desvelado en la solicitud de patente China n.º
50 200510019084 de los presentes inventores. El arroz con cáscara se descascaró para obtener arroz semipulido y después se molió para obtener arroz molido con una finura de malla de 80~100. El arroz molido se mezcló con un tampón de extracción en una relación de 1:5 (p/v, kg/l) y se extrajo durante 1,5 horas a 60 °C. El tampón de extracción comprende tampón fosfato 25 mM, acetato sódico 20 mM, sulfato de amonio 10 mM, caprilato sódico 10 mM, y tiene un pH de 7,5. La mezcla resultante se ajustó a pH 4,5 con ácido acético y se puso durante al menos
55 3 horas para precipitar proteínas no diana. Después, la mezcla resultante se sometió secuencialmente a filtración a presión usando un filtro prensa de placas y marcos (tipo tela filtrante) y microfiltración por columna de fibras huecas con un tamaño de poro de 0,22 μm , para obtener un sobrenadante que contenía rHSA. La concentración de rHSA era de aproximadamente 0,66 mg/ml.

Ejemplo 2: Cromatografía de intercambio catiónico como purificación primaria

1. Cromatografía de intercambio catiónico realizada en medio UNO Sphere S

5 Una columna XK16/100 se rellenó con aproximadamente 8,7 ml de medio UNO Sphere S y se equilibró con 200 ml de tampón de equilibrio (acetato sódico anhidro 2 g/L, se añadió ácido acético para ajustar el pH a 4,5) a un caudal de 300 cm/h hasta que el pH del efluente fue estable. Se cargaron 250 ml de la muestra de extracto de rHSA obtenida en el ejemplo 1 en la columna a un caudal de 600 cm/h. La muestra tenía una conductividad de 6,1 ms/cm y un pH de 4,53. Después de la carga, la muestra se eluyó con un tampón de elución (acetato sódico 2 g/L, ácido acético, pH 5,2, cloruro sódico 14,61 g/L) a un caudal de 300 cm/h. El eluato se recogió y se visualizó por SDS-PAGE para obtener las fracciones que contenían rHSA. El electroforetograma se mostró en la figura 1A.

2. Cromatografía de intercambio catiónico realizada en medio Nuvia S

15 Una columna XK16/100 se rellenó con aproximadamente 9,3 ml de medio Nuvia S y se equilibró con 200 ml de tampón de equilibrio (acetato sódico anhidro 2 g/l, se añadió ácido acético para ajustar el pH a 4,5) a un caudal de 300 cm/h hasta que el pH del efluente fue estable. Se cargaron 250 ml de la muestra de extracto de rHSA obtenida en el ejemplo 1 en la columna a un caudal de 300 cm/h. La muestra tenía una conductividad de 6,3 ms/cm y un pH de 4,56. Después de la carga, la muestra se eluyó con un tampón de elución (acetato sódico 2 g/L, ácido acético, pH 5,0, cloruro sódico 14,61 g/l) a un caudal de 300 cm/h. El eluato se recogió y se visualizó por SDS-PAGE para obtener las fracciones que contenían rHSA. El electroforetograma se mostró en la figura 1B.

3. Cromatografía de intercambio catiónico realizada en medio Capto MMC

25 Una columna XK16/100 se rellenó con aproximadamente 15,1 ml de medio Capto MMC y se equilibró con 200 ml de tampón de equilibrio (acetato sódico anhidro 2 g/l, se añadió ácido acético para ajustar el pH a 4,5) a un caudal de 300 cm/h hasta que el pH del efluente fue de 4,5 y estable. Se cargaron 250 ml de la muestra de extracto de rHSA obtenida en el ejemplo 1 en la columna a un caudal de 600 cm/h. La muestra tenía una conductividad de 6,3 ms/cm y un pH de 4,56. Después de la carga, la muestra se eluyó con tampón de elución (acetato sódico 2 g/l, ácido acético, pH 4,7, cloruro sódico 58,44 g/L) a un caudal de 300 cm/h para eliminar las impurezas y después se eluyó con tampón de elución (fosfato diácido sódico 0,3 g/L, fosfato ácido disódico 3,5 g/L, cloruro sódico 58,44 g/L, pH 6,7) para obtener las fracciones que contenían rHSA. El electroforetograma se mostró en la figura 1C.

4. Cromatografía de intercambio catiónico realizada en medio MacroPrep-CM

35 Una columna XK16/100 se rellenó con aproximadamente 10 ml de medio MacroPrep-CM y se equilibró con 300 ml de tampón de equilibrio (acetato sódico anhidro 2 g/L, se añadió ácido acético para ajustar el pH a 4,5) a un caudal de 200 cm/h hasta que el pH del efluente fue de 4,5 y estable. Se cargaron 250 ml de la muestra de extracto de rHSA obtenida en el ejemplo 1 en la columna a un caudal de 300 cm/h. La muestra tenía una conductividad de 6,3 ms/cm y un pH de 4,56. Después de la carga, la muestra se lavó con tampón de lavado (acetato sódico 2 g/l, ácido acético, pH 4,7, cloruro sódico 58,44 g/l) a un caudal de 200 cm/h para eliminar las impurezas y después se eluyó con tampón de elución (fosfato diácido sódico 0,3 g/l, fosfato ácido disódico 3,5 g/L, cloruro sódico 5,84 g/L, pH 6,5) para obtener las fracciones que contenían rHSA. El electroforetograma se mostró en la figura 1D.

45 5. Comparación de la capacidad de carga entre medio Nuvia S y medio UNO Sphere S

Dos columnas XK16/100 se rellenaron con aproximadamente 5 ml de medio Nuvia S y medio UNO Sphere S respectivamente, y se equilibraron con 200 ml de tampón de equilibrio (acetato sódico anhidro 2 g/l, se añadió ácido acético para ajustar el pH a 4,5) a un caudal de 300 cm/h hasta que el pH del efluente fue de 4,5. La muestra de extracto de rHSA obtenida en el ejemplo 1 se cargó en la columna Nuvia S y la columna UNO Sphere S a un caudal de 300 cm/h, respectivamente. El valor de absorción de UV280 durante la carga de la muestra se registró hasta que el valor de absorción estuvo más allá de la meseta en un 10 %. El volumen de muestra se registró y se calculó la capacidad de carga real por mililitro de Nuvia S o UNO Sphere S a un caudal de 300 cm/h, respectivamente.

55 Además, la columna UNO Sphere S se equilibró con tampón de equilibrio (acetato sódico anhidro 2 g/l, se añadió ácido acético para ajustar el pH a 4,5) a un caudal de 300 cm/h hasta que el pH del efluente fue de 4,5. El extracto de rHSA obtenido en el ejemplo 1 se cargó sobre la columna UNO Sphere S a un caudal de 600 cm/h y el valor de absorción de UV280 durante la carga de la muestra se registró hasta que el valor de absorción estuvo más allá de la meseta en un 10 %. El volumen de muestra se registró y se calculó la capacidad de carga real por mililitro de UNO

Sphere S a un caudal de 600 cm/h. La comparación de la capacidad de carga se mostró en la figura 2.

Ejemplo 3: Cromatografía de intercambio aniónico como purificación primaria

5 1. Cromatografía de intercambio aniónico realizada en medio UNO Sphere Q

Una columna biológica 15/200 se rellenó con aproximadamente 10 ml de medio UNO Sphere Q y se equilibró con 200 ml de tampón de equilibrio (fosfato diácido sódico 0,3 g/L, fosfato ácido disódico 3,5 g/L, se añadió hidróxido sódico o ácido clorhídrico para ajustar el pH a 7,5) a un caudal de 300 cm/h hasta que el pH del efluente fue de 7,5.

10 Se ajustaron 250 ml de la muestra de extracto de rHSA obtenida en el ejemplo 1 a pH 7,5 y se diluyó con el tampón hasta que la conductividad fue menor de 10,0 ms, y después se cargó sobre la columna UNO Sphere Q a un caudal de 300 cm/h. La muestra se lavó con tampón de lavado (fosfato diácido sódico 0,3 g/l, fosfato ácido disódico 3,5 g/l, cloruro sódico 11,68 g/l) para eliminar las impurezas y después se eluyó con tampón de elución (fosfato diácido sódico 0,3 g/l, fosfato ácido disódico 3,5 g/l, cloruro sódico 23,36 g/l) para recoger las fracciones que contenían

15 rHSA. El electroforetograma se mostró en la figura 3A.

2. Cromatografía de intercambio aniónico realizada en medio Q Sepharose FF

Una columna biológica 15/200 se rellenó con aproximadamente 10 ml de medio Q Sepharose FF y se equilibró con 200 ml de tampón de equilibrio (fosfato diácido sódico 0,3 g/l, fosfato ácido disódico 3,5 g/l, se añadió hidróxido sódico o ácido clorhídrico para ajustar el pH a 7,0) a un caudal de 300 cm/h hasta que el pH del efluente fue de 7,0. Se ajustaron 250 ml de la muestra de extracto de rHSA obtenida en el ejemplo 1 a pH 6,8 y se diluyó con el tampón hasta que la conductividad fue menor de 10,0 ms/cm, y después se cargó sobre la columna Q Sepharose FF a un caudal de 300 cm/h. La muestra se eluyó con tampón de elución (fosfato diácido sódico 0,3 g/l, fosfato ácido

25 disódico 3,5 g/l, cloruro sódico 5,84 g/l) para recoger las fracciones que contenían rHSA. El electroforetograma se mostró en la figura 3B.

3. Ensayo para la capacidad de carga real de Q Sepharose FF

30 Una columna 10/100 se rellenó con aproximadamente 5 ml de medio Q Sepharose FF y se equilibró con 200 ml de tampón de equilibrio (fosfato diácido sódico 0,3 g/l, fosfato ácido disódico 3,5 g/l, se añadió hidróxido sódico o ácido clorhídrico para ajustar el pH a 7,0) a un caudal de 300 cm/h hasta que el pH del efluente fue de 7,0 y estable. Se ajustaron 250 ml de la muestra de extracto de rHSA obtenida en el ejemplo 1 a pH 7,5 y se diluyó con el tampón hasta que la conductividad fue menor de 10,0 ms/cm y el volumen total fue de 1000 ml. La muestra se cargó sobre la

35 columna Q Sepharose FF a un caudal de 300 cm/h. El valor de absorción de UV280 durante la carga de la muestra se registró hasta que el valor de absorción estuvo más allá de la meseta en un 10 %. El volumen de muestra se registró y se calculó la capacidad de carga real por mililitro de Q Sepharose FF a un caudal de 300 cm/h. Después, la resina se regeneró.

40 La muestra de extracto de rHSA obtenida en el ejemplo 1 se ajustó a pH 7,0 y se diluyó con el tampón hasta que la conductividad fue menor de 10,0 ms y después se concentró a 400 ml a través de un casete de membrana GE 30KD. Se usó un método de ácido sulfúrico-fenol para determinar el contenido de polisacáridos antes y después de la diálisis. Después, la muestra se cargó en una columna Q Sepharose FF equilibrada. El valor de absorción de UV280 durante la carga de la muestra se registró hasta que el valor de absorción estuvo más allá de la meseta en

45 un 10 %. El volumen de muestra se registró y se calculó la capacidad de carga real por mililitro de Q Sepharose FF a un caudal de 300 cm/h. El cambio de la capacidad de carga y el cambio del contenido de polisacáridos se mostraron en la figura 4.

Ejemplo 4: Cromatografía de intercambio aniónico como purificación secundaria

50 La fracción que contenía rHSA obtenida en el ejemplo 2 se dividió en dos partes iguales para su uso en los siguientes experimentos.

1. Cromatografía de intercambio aniónico realizada en medio Q Sepharose FF

55 Una columna 15/200 se rellenó con aproximadamente 7 ml de Q Sepharose FF y se equilibró con 200 ml de tampón de equilibrio (fosfato diácido sódico 0,3 g/l, fosfato ácido disódico 3,5 g/l, se añadió hidróxido sódico o ácido clorhídrico para ajustar el pH a 7,0) a un caudal de 300 cm/h hasta que el pH del efluente fue de 7,0. Una parte de la fracción anterior se ajustó a pH 7,0 y se diluyó con el tampón hasta que la conductividad fue menor de 10,0 ms. La

muestra se cargó sobre la columna Q Sepharose FF a un caudal de 300 cm/h y después se eluyó con tampón de elución (fosfato diácido sódico 0,3 g/l, fosfato ácido disódico 3,5 g/l, cloruro sódico 11,68 g/l) para recoger las fracciones que contenían rHSA. El electroforetograma se mostró en la figura 5A.

5 2. Cromatografía de intercambio aniónico realizada en medio DEAE Sepharose FF

Una columna 15/200 biológica se rellenó con aproximadamente 8 ml de DEAE Sepharose FF y se equilibró con 200 ml de tampón de equilibrio (fosfato diácido sódico 0,3 g/l, fosfato ácido disódico 3,5 g/l, con hidróxido sódico o ácido clorhídrico añadido para ajustar el pH a 7,0) a un caudal de 300 cm/h hasta que el pH del efluente fue de 7,0.

10 Otra parte de la fracción anterior se ajustó a pH 7,5 y se diluyó con el tampón hasta que la conductividad fue menor de 10,0 ms. La muestra se cargó sobre la columna DEAE Sepharose FF a un caudal de 300 cm/h y después se diluyó con tampón de elución (fosfato diácido sódico 0,3 g/l, fosfato ácido disódico 3,5 g/l, cloruro sódico 11,68 g/l) para recoger las fracciones que contenían rHSA. El electroforetograma se mostró en la figura 5B.

15 **Ejemplo 5: Cromatografía hidrófoba como purificación final**

1. Cromatografía hidrófoba realizada en medio Fenil sepharose HP

Una columna XK16/100 se rellenó con aproximadamente 8 ml de Fenil sepharose HP y se equilibró con 200 ml de tampón de equilibrio (acetato sódico anhidro 2,32 g/l, fosfato diácido sódico 2,81 g/l, sulfato de amonio 66 g/l) a un caudal de 100 cm/h. Se añadieron 20 ml de la fracción que contenía rHSA obtenida en el ejemplo 4 (Q Sepharose FF) con sulfato de amonio (0,4 M) para hacer que la conductividad fuese de 80,0 ms. Después, la muestra se cargó en la columna a un caudal de 100 cm/h. El fluido de transmisión se recogió para obtener las fracciones que contenían rHSA. El electroforetograma se mostró en la figura 6A.

25

2. Cromatografía hidrófoba realizada en medio Fenil sepharose FF

Una columna XK16/100 se rellenó con aproximadamente 10 ml de Fenil sepharose FF y se equilibró con 200 ml de tampón de equilibrio (acetato sódico anhidro 2,32 g/l, fosfato diácido sódico 2,81 g/l, sulfato de amonio 13,2 g/l) a un caudal de 150 cm/h. Se añadieron 20 ml de la fracción que contenía rHSA obtenida en el ejemplo 4 (Q Sepharose FF) con sulfato de amonio (0,1 M) para hacer que la conductividad fuese de 80,0 ms. Después, la muestra se aplicó a la columna a un caudal de 150 cm/h. El fluido de transmisión se recogió para obtener las fracciones que contenían rHSA. El electroforetograma se mostró en la figura 6B.

35 3. Cromatografía hidrófoba realizada en medio MacroPrep-t-Butilo

Una columna 15/200 se rellenó con aproximadamente 6 ml de MacroPrep-t-Butilo y se equilibró con 200 ml de tampón de equilibrio (acetato sódico anhidro 2,32 g/l, fosfato diácido sódico 2,81 g/l, sulfato de amonio 13,2 g/l) a un caudal de 150 cm/h. Se añadieron 20 ml de la fracción que contenía rHSA obtenida en el ejemplo 3 (Q Sepharose FF) con sulfato de amonio (1,0 M, 0,8 M, 0,6 M, respectivamente) para hacer que la conductividad fuese de 130,0 ms, 90,0 ms, 70,0 ms, respectivamente. Después, las muestras se aplicaron a las columnas a un caudal de 150 cm/h. El fluido de transmisión se recogió para obtener las fracciones que contenían rHSA. El electroforetograma se mostró en la figura 6C.

45 **Ejemplo 6: Separación y purificación de rHSA del extracto que contiene rHSA**

Etapa 1): Cromatografía de intercambio catiónico realizada en UNO Sphere S como purificación primaria

Una columna XK16/20 se rellenó con aproximadamente 12 ml de medio UNO Sphere S y se equilibró con 500 ml de tampón de equilibrio (acetato sódico anhidro 2 g/l, ácido acético, pH 4,5) a un caudal de 300 cm/h. Se cargaron 300 ml de la muestra de extracto que contenía rHSA obtenida en el ejemplo 1 en la columna a un caudal de 600 cm/h. La muestra tenía una conductividad de 6,5 ms/cm y un pH de 4,5. Después de la carga, la muestra se eluyó con tampón de elución (acetato sódico 2 g/l, ácido acético, pH 5,0, cloruro sódico 14,61 g/l) a un caudal de 200 cm/h. El eluato se recogió y se observó por SDS-PAGE para obtener las fracciones que contenían rHSA. El electroforetograma se mostró en la figura 7A.

55

Etapa 2): Cromatografía de intercambio aniónico realizada en Q Sepharose FF como purificación secundaria

Una columna XK16/100 se rellenó con aproximadamente 13 ml de medio Q Sepharose FF y se equilibró con 400 ml

de tampón de equilibrio (acetato sódico anhidro 6,51 g/l, fosfato diácido sódico 0,72 g/l, pH 6,8) a un caudal de 300 cm/h. La fracción que contenía rHSA obtenida en la etapa anterior se diluyó hasta aproximadamente 200 ml con una conductividad de menos de 10,0 ms y después se cargó en la columna a un caudal de 300 cm/h. La muestra tenía una conductividad de 8,3 ms/cm y un pH de 6,8. Después de la carga, la muestra se eluyó con tampón de elución (fosfato ácido disódico 6,51 g/l, fosfato diácido sódico 0,72 g/l, cloruro sódico 11,69 g/l) a un caudal de 100 cm/h. El eluato se recogió y se observó por SDS-PAGE. Las fracciones que contenían rHSA se recogieron. El electroforetograma se mostró en la figura 7B.

Etapa 3): Cromatografía hidrófoba realizada en Fenil sepharose HP como purificación final

10

Una columna XK16/100 se rellenó con aproximadamente 12 ml de Fenil sepharose HP y se equilibró con 200 ml de tampón de equilibrio (acetato sódico anhidro 2,32 g/l, fosfato diácido sódico 2,81 g/l, sulfato de amonio 66 g/l) a un caudal de 100 cm/h. Se añadieron 20 ml de la fracción que contenía rHSA obtenida en la etapa previa con sulfato de amonio para hacer que la conductividad fuese de 90,0 ms. Después, la muestra se cargó en la columna a un caudal de 100 cm/h. El fluido de transmisión se recogió para obtener las fracciones que contenían rHSA. El electroforetograma se mostró en la figura 7C. El cromatograma de HPLC del producto de rHSA purificada se mostró en la figura 8. La rHSA tiene una pureza de más del 99 % (monómero más dímero y polímero) por HPLC.

Ejemplo 7: Separación y purificación de rHSA del extracto que contiene rHSA

20

Este ejemplo emplea un método de cuatro etapas para separar y purificar rHSA sometiendo secuencialmente el extracto de rHSA en bruto del Ejemplo 1 a cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de hidroxapatita cerámica y cromatografía hidrófoba, realizada en UNOsphere S, Q Sepharose FF, hidroxapatita cerámica Macro-prep de tipo I y Fenil Sepharose HP como medios cromatográficos, respectivamente. La cromatografía de intercambio catiónico y la cromatografía de intercambio aniónico en el presente documento son las mismas que las del Ejemplo 6.

Una columna CHT se rellenó con aproximadamente 15 ml de medio de hidroxapatita cerámica Macro-prep de tipo I y se equilibró con 200 ml de tampón de equilibrio (fosfato sódico 20 mM + cloruro sódico 50 mM, pH 7,5) a un caudal de 100 cm/h. La fracción que contenía rHSA obtenida a partir de cromatografía de intercambio aniónico se cargó directamente sobre la columna a un caudal de 100 cm/h. La muestra tenía una conductividad de 26 ms/cm y un pH de 7,4~7,6. Después de la carga, la muestra se eluyó con un tampón de elución (fosfato sódico 500 mM, pH 7,5). El fluido de transmisión se recogió para obtener la fracción que contenía rHSA. La capacidad de purificación de rHSA se estimó que era ≤ 30 mg/g de CHT I y la tasa de recuperación de rHSA fue hasta ≥ 80 %. Por último, la columna de hidroxapatita cerámica CHT debe regenerarse con 3-5 volúmenes de columna de tampón fosfato sódico 500 mM a pH 7,0. La columna puede higienizarse en NaOH 1-2 N y se almacena en NaOH 0,1 N si se desea. El electroforetograma se mostró en la figura 9.

Después, la fracción que contenía rHSA obtenida anteriormente se sometió a cromatografía hidrófoba de acuerdo con el procedimiento similar al Ejemplo 6. El fluido de transmisión se recogió para obtener la fracción que contenía rHSA. El cromatograma de HPLC del producto de rHSA purificada se mostró en la figura 10. La rHSA tiene una pureza de aproximadamente el 99 % (únicamente monómero) por HPLC.

Ejemplo 8: Separación y purificación de rHSA del extracto que contiene rHSA

45

El ejemplo se realizó mediante el mismo método que el Ejemplo 7 excepto que la cromatografía de hidroxapatita cerámica se realizó en hidroxapatita cerámica Macro-prep de Tipo II como medio cromatográfico.

Una columna CHT se rellenó con aproximadamente 15 ml de medio hidroxapatita cerámica Macro-prep de Tipo II y se equilibró con 200 ml de tampón de equilibrio (fosfato sódico 20 mM + cloruro sódico 50 mM, pH 7,0) a un caudal de 100 cm/h. La fracción que contenía rHSA obtenida a partir de cromatografía de intercambio aniónico se cargó directamente sobre la columna a un caudal de 100 cm/h. La muestra tenía una conductividad de 26 ms/cm y un pH de 7,4~7,6. Después de la carga, la muestra se eluyó con un tampón de elución (fosfato sódico 500 mM, pH 7,0). El fluido de transmisión se recogió para obtener la fracción que contenía rHSA. La capacidad de purificación de rHSA se estimó que era ≤ 25 mg/g de CHT II y la tasa de recuperación de rHSA fue hasta ≥ 85 %. Por último, la columna de hidroxapatita cerámica CHT debe regenerarse con 3~5 volúmenes de columna de tampón fosfato sódico 500 mM a pH 7,0. La columna puede higienizarse en NaOH 1-2 N y almacenarse en NaOH 0,1 N si se desea.

Después, la fracción que contenía rHSA obtenida de la etapa anterior se sometió a cromatografía hidrófoba de

acuerdo con el procedimiento similar al Ejemplo 7. El fluido de transmisión se recogió para obtener la fracción que contenía rHSA. El electroforetograma se mostró en la figura 11. El cromatograma de HPLC del producto de rHSA purificada se mostró en la figura 12. La rHSA tiene una pureza de aproximadamente el 99 % (únicamente monómero) por HPLC.

5

Puede observarse a partir de los resultados de los Ejemplos 6~8 que la cromatografía de hidroxiapatita cerámica aumenta el contenido en monómeros en el producto de rHSA final de forma eficaz, permitiéndole tener hasta aproximadamente el 99 % de pureza. Además, la cromatografía de hidroxiapatita cerámica se opera de forma sencilla, ya que usó el flujo continuo para la rHSA purificada adicionalmente del mismo modo que se usó en la etapa de Fenil sepharose HP, y la solución de eluyente es compatible sin ajustar la concentración de sal y el valor de pH.

10

Mediante cromatografía de hidroxiapatita cerámica, la rHSA purificada puede satisfacer los requisitos para su aplicación clínica.

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar y purificar albúmina sérica humana recombinante a partir de grano de arroz transgénico, secuencialmente que comprende las etapas de:
- 5
- 1) someter extracto en bruto de albúmina sérica humana recombinante a cromatografía de intercambio catiónico para obtener el producto primario I;
 - 2) someter el producto primario I a cromatografía de intercambio aniónico para obtener el producto secundario II;
 - 3) someter el producto secundario II a cromatografía hidrófoba para obtener albúmina sérica humana recombinante
- 10 purificada;
- donde el método comprende adicionalmente una etapa de someter el producto secundario II a cromatografía de hidroxiapatita cerámica antes de la cromatografía hidrófoba de la etapa 3).
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la cromatografía de intercambio catiónico se realiza en un medio de cromatografía seleccionado del grupo que consiste en UNO Sphere S, Capto MMC, Nuvia S y MacroPrep-CM.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, donde la cromatografía de intercambio catiónico se
- 20 realiza en UNO Sphere S o Capto MMC.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la cromatografía de intercambio aniónico se realiza en un medio de cromatografía seleccionado del grupo que consiste en Q Sepharose FF, UNO Sphere Q y DEAE sepharose FF.
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, donde la cromatografía de intercambio aniónico se realiza en Q Sepharose FF.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la cromatografía hidrófoba se realiza en un medio
- 30 de cromatografía seleccionado del grupo que consiste en Fenil sepharose HP, Fenil sepharose FF, macro-prep t-butilo y macro-prep metilo.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde la cromatografía hidrófoba se realiza en Fenil sepharose HP.
- 35 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la cromatografía de hidroxiapatita cerámica se realiza en un medio de cromatografía seleccionado de medios de hidroxiapatita cerámica de tipo I y tipo II Macro-prep.
- 40 9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho extracto en bruto de la albúmina sérica humana recombinante se prepara mediante un método que comprende las etapas de:
- i) mezclar grano de arroz transgénico molido que contiene albúmina sérica humana recombinante con un tampón de extracción en una relación p/v (kg/L) de 1:5 y extraer a 55~60 °C durante 1~1,5 horas para obtener la mezcla I;
 - 45 comprendiendo dicho tampón de extracción tampón fosfato 10~30 mM, acetato sódico 10~20 mM, sulfato de amoníaco 15~30 mM y caprilato sódico 5~20 mM, con un pH de 6,5~8;
 - ii) ajustar el pH de la mezcla I de la etapa i) a 4,0~4,5 y precipitarlo durante 3-12 horas para obtener la mezcla II;
 - 50 iii) filtrar la mezcla II de la etapa ii) y recoger el filtrado para obtener un extracto en bruto que contiene una alta concentración de albúmina sérica humana recombinante; comprendiendo dicha filtración las etapas de filtrar por filtración a presión con un filtro prensa de placas y marcos de tipo tela filtrante, después filtrar por microfiltración con una membrana de fibras huecas de polietersulfona con un tamaño de poro de 0,20 µm~0,45 µm.
- 55 10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la cromatografía de intercambio catiónico emplea un tampón de carga que comprende un tampón acetato con un pH menor de 5,0; y la cromatografía de intercambio catiónico emplea un tampón de elución que comprende un tampón acetato y cloruro sódico, o tampón fosfato y cloruro sódico; con un pH de 5,0~6,7.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 2, donde la cromatografía de intercambio catiónico se realiza en:
- i) UNO Sphere S y emplea un tampón de elución que comprende un tampón acetato, cloruro sódico 0,25 M, con un pH de 5,2; o
 - ii) Nuvia S y emplea un tampón de elución que comprende un tampón acetato, cloruro sódico 0,25 M, con un pH de 5,0; o
- 10 iii) Capto MMC, y emplea un tampón de lavado que comprende un tampón acetato, cloruro sódico 1 M, con un pH de 4,7 para eliminar las proteínas no diana, y un tampón de elución que comprende un tampón acetato, cloruro sódico 1 M, con un pH de 6,7 para eluir la albúmina sérica humana recombinante; o
- 15 iv) MacroPrep-CM, y emplea un tampón de lavado que comprende un tampón acetato, cloruro sódico 1 M, con un pH de 4,7 para eliminar las proteínas no diana, y un tampón de elución que comprende un tampón acetato, cloruro sódico 1 M, con un pH de 6,5 para eluir la albúmina sérica humana recombinante.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la cromatografía de intercambio aniónico se realiza en Q Sepharose FF y emplea un tampón de elución que comprende un tampón fosfato, cloruro sódico 20 0,25 M, con un pH de 6,0~7,0.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 4, donde la cromatografía de intercambio aniónico se realiza en DEAE sepharose FF, y emplea un tampón de lavado que comprende un tampón fosfato, cloruro sódico 0,1 M con un pH de 6,0~7,0 para eliminar las proteínas no diana, y un tampón de elución que comprende un tampón 25 fosfato, cloruro sódico 0,25 M, con un pH de 6,0~7,0 para eluir la albúmina sérica humana recombinante.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde en la cromatografía hidrófoba, el producto secundario II a purificar comprende adicionalmente sulfato de amoníaco a una concentración de 0,1 M a 1 M.
- 30 15. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde la cromatografía hidrófoba se realiza en Fenil sepharose HP, y el producto secundario II a purificar comprende adicionalmente sulfato de amoníaco a una concentración de 0,4 M; o
- 35 la cromatografía hidrófoba se realiza en Fenil sepharose FF, y el producto secundario II a purificar comprende adicionalmente sulfato de amoníaco a una concentración de 0,1 M; o
- la cromatografía hidrófoba se realiza en MacroPrep-t-Butilo, y el producto secundario II a purificar comprende adicionalmente sulfato de amoníaco a una concentración de 0,6 M a 1,0 M.
- 40 16. El método de acuerdo con la reivindicación 8, donde la cromatografía de hidroxiapatita cerámica emplea un tampón de elución que comprende un tampón fosfato con un pH de 7,0~7,5.

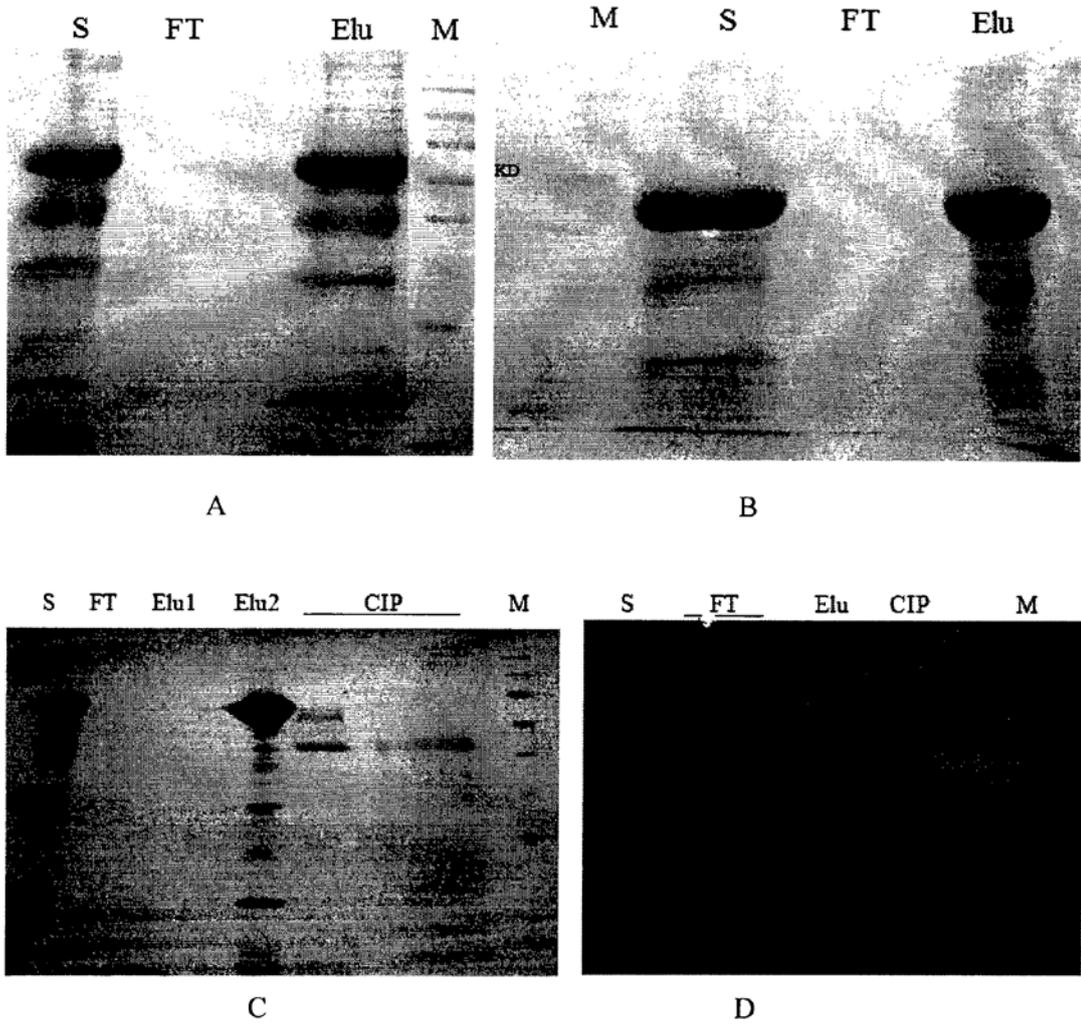


Fig. 1

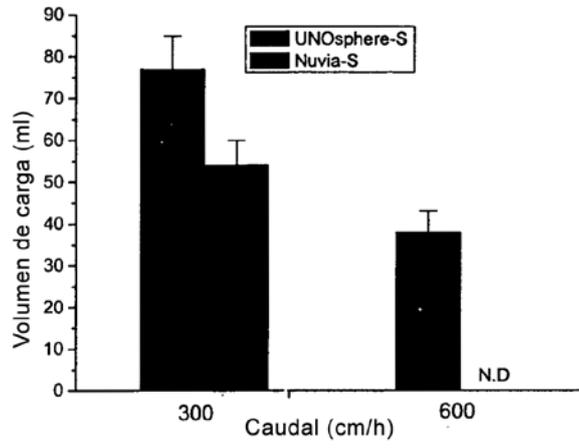


Fig. 2

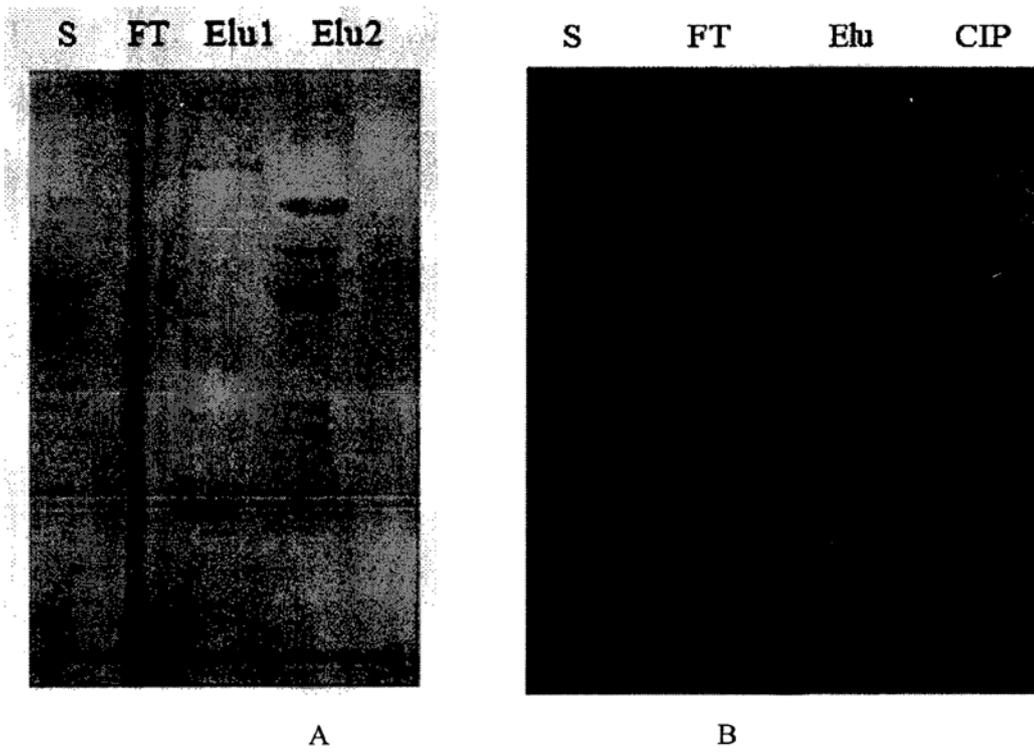


Fig. 3

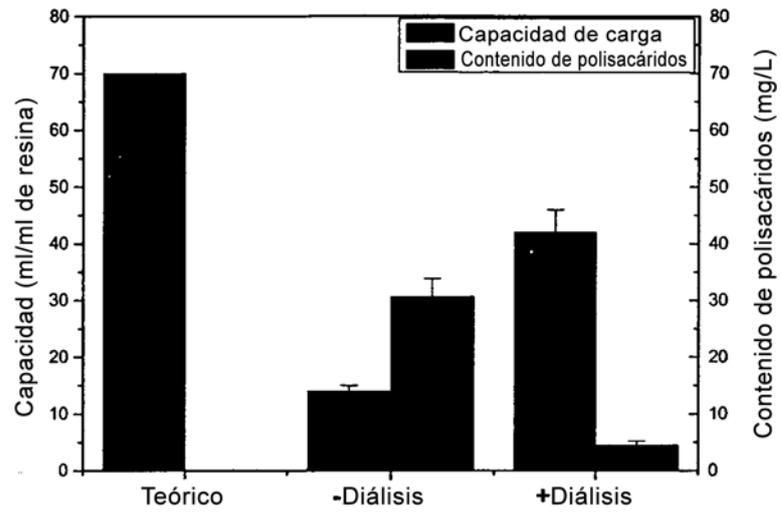


Fig. 4

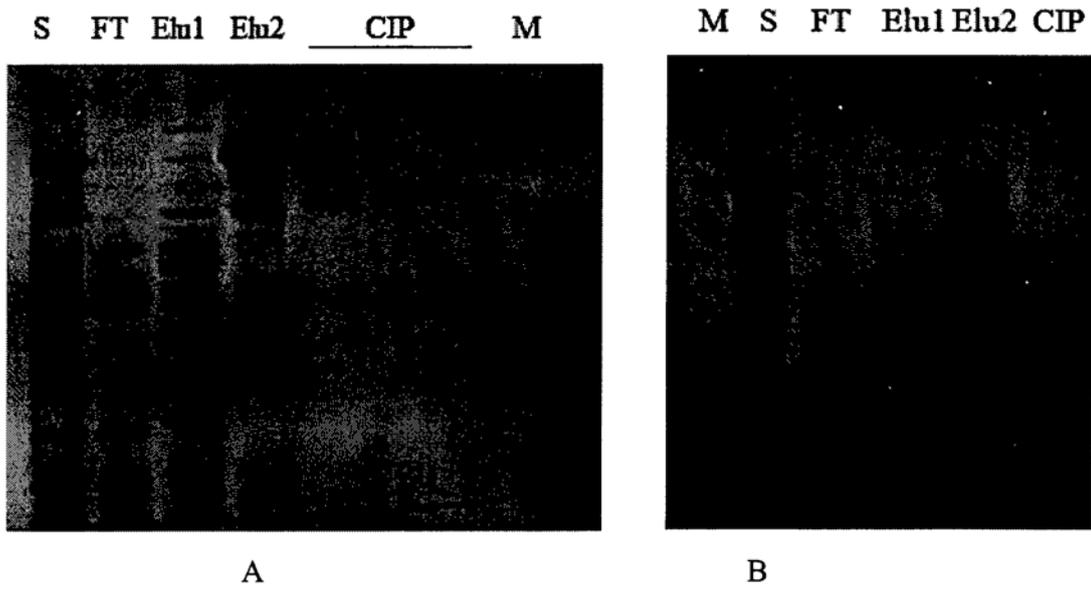


Fig. 5

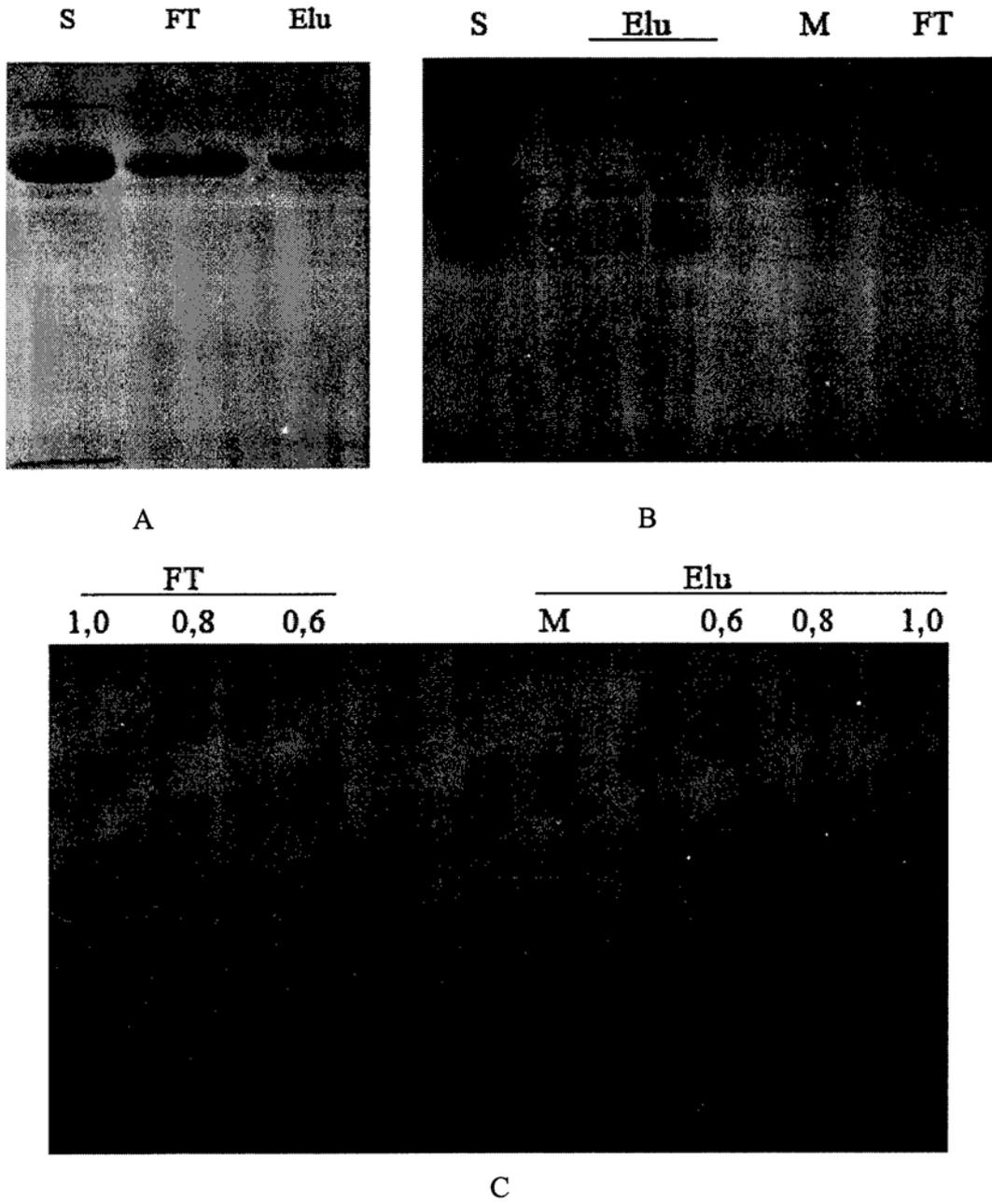


Fig. 6

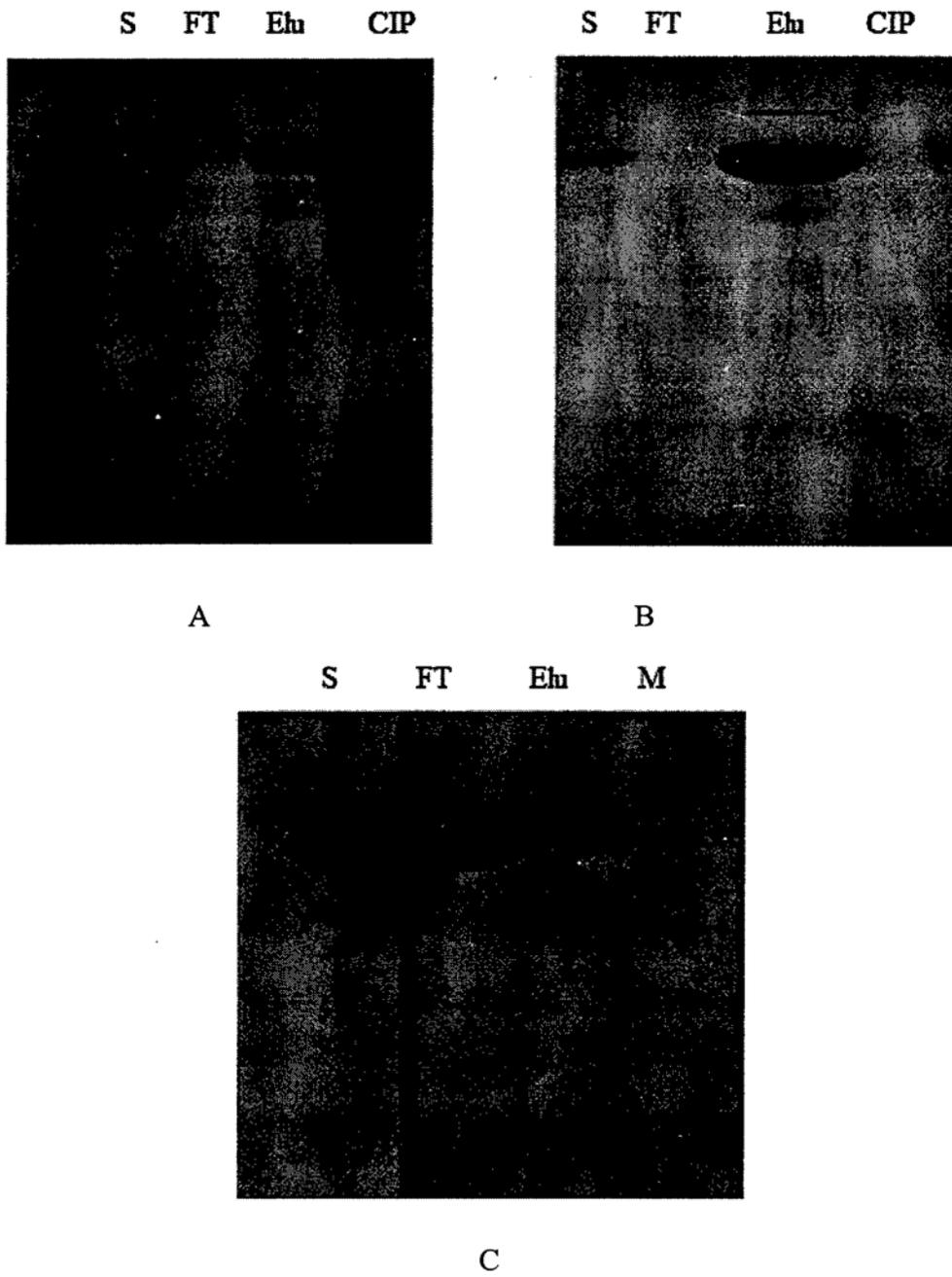
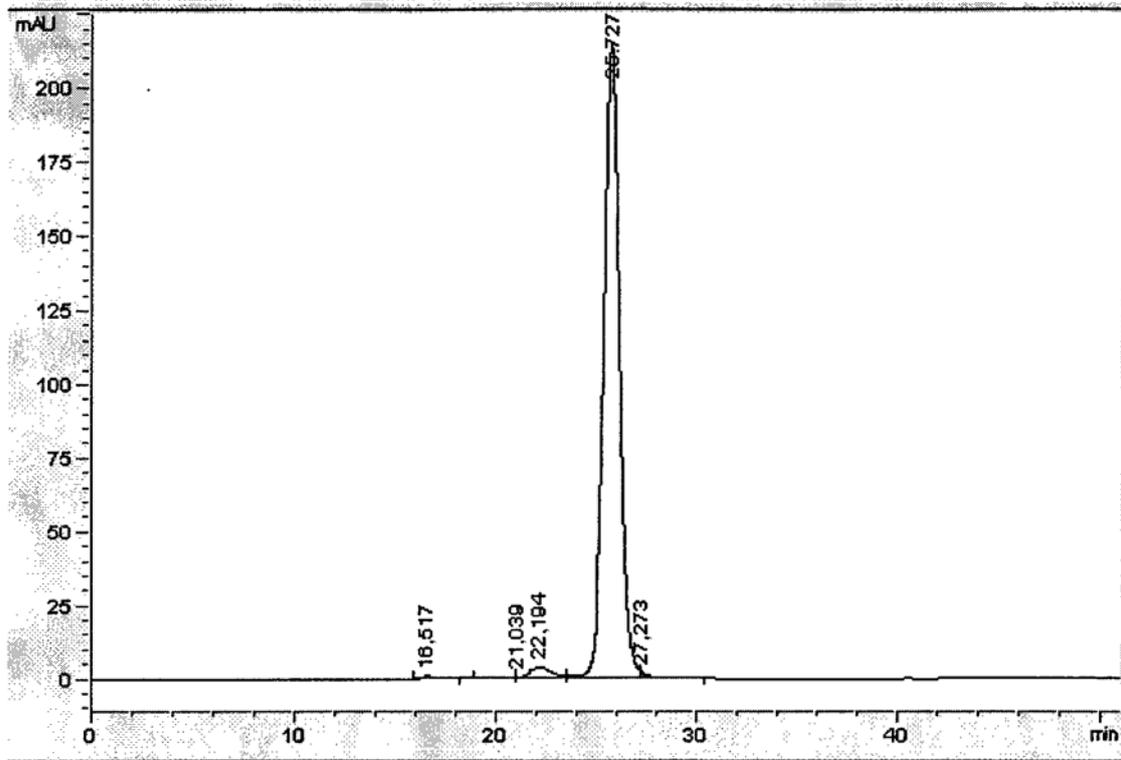


Fig. 7



#	Tiempo	Área	Alto	Ancho	Factor simétrico	% de área
1	16,517	56,7	9,5E-1	0,9955	0,308	0,462
2	21,039	15,4	3,1E-1	0,8197	2,522	0,125
3	22,194	290,3	3,8	1,2808	0,907	2,367
4	25,727	11843,6	214,3	0,9211	0,952	96,589
5	27,273	55,9	1,9	0,3545	0	0,456

Fig. 8

CHT I

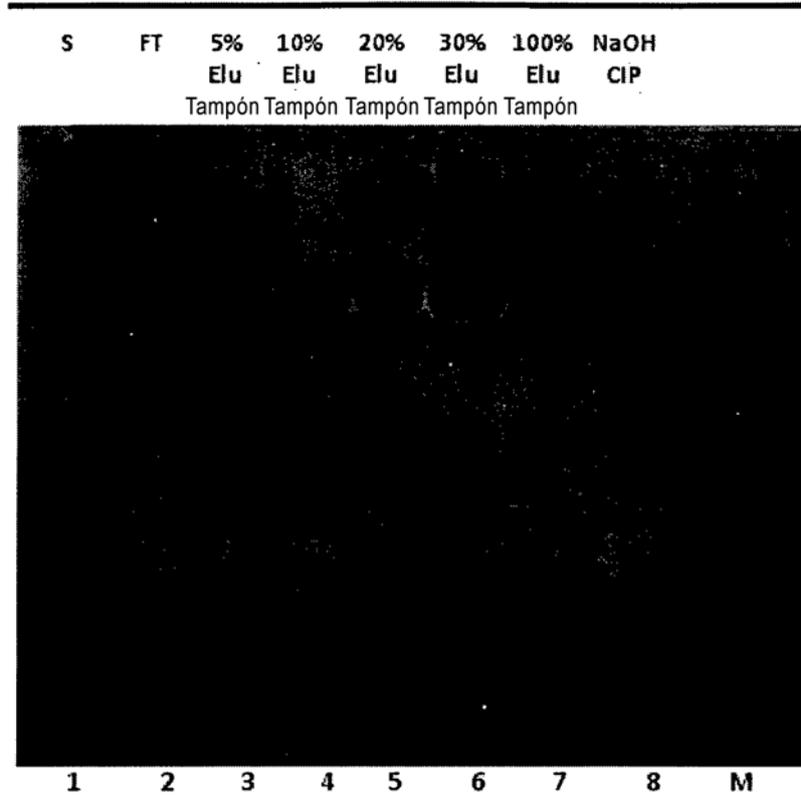
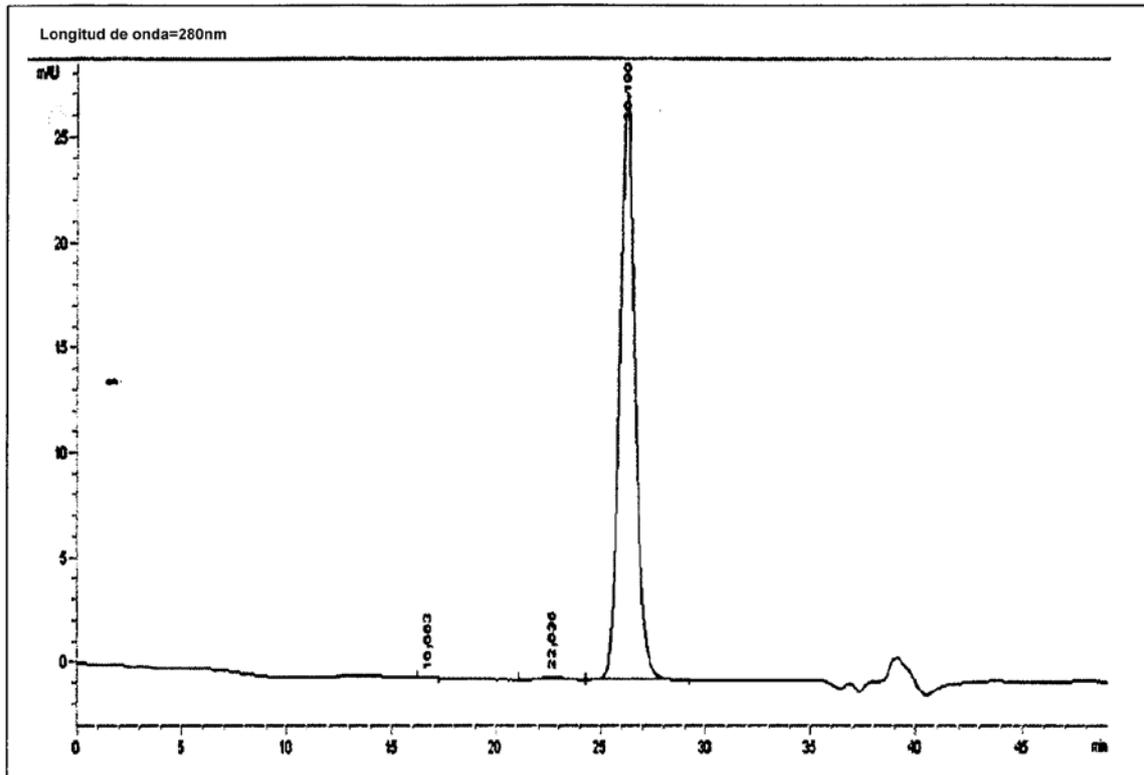


Fig. 9



#	Tiempo	Área	Alto	Ancho	Factor simétrico	% de área
1	16.663	1	2,9E-2	0,5724	0,966	0,069
2	22.635	13,6	1,8E-1	1,2672	0,836	0,934
3	26,19	1445,4	27,9	0,8619	0,853	98,998

	polímero (%)	dímero (%)	monómero (%)
Contenido	0,069	0,934	98,998

Fig. 10

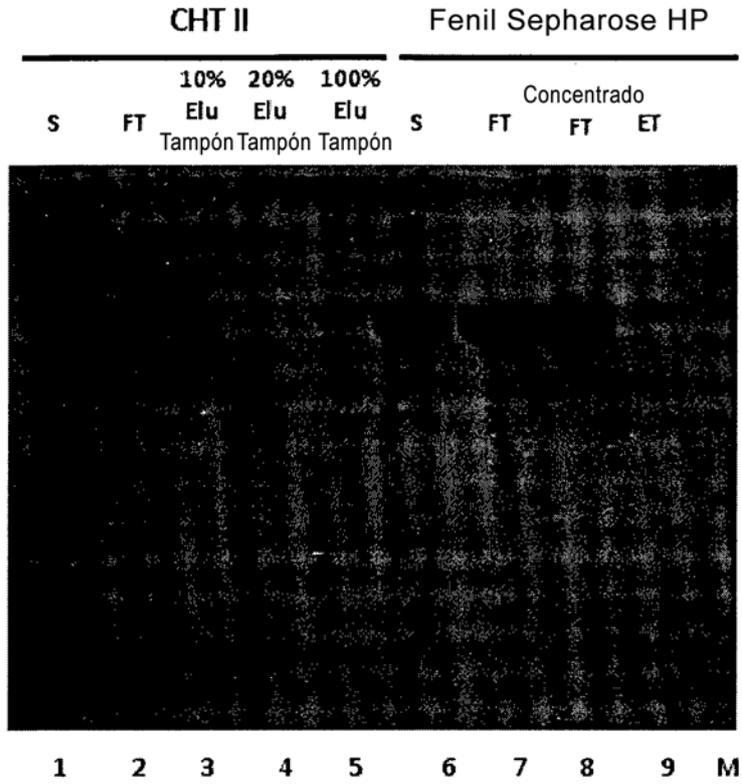
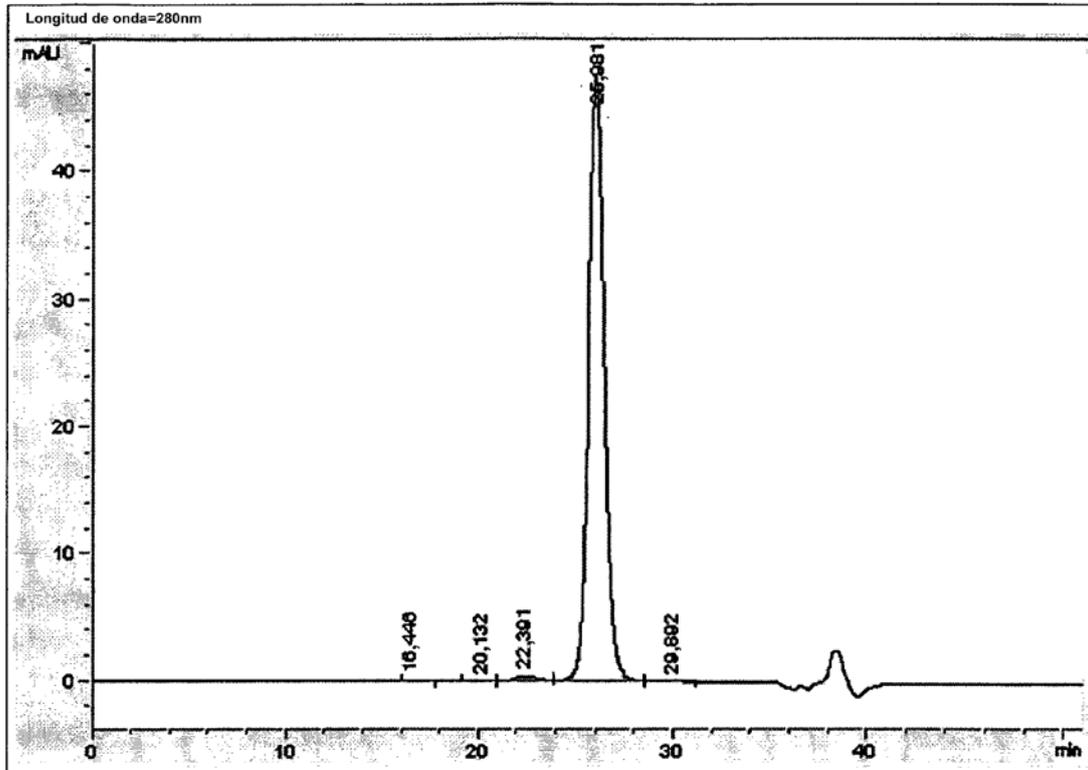


Fig. 11



#	Tiempo	Área	Alto	Ancho	Factor simétrico	% de área
1	16,446	4	8,1E-2	0,8184	0,232	0,145
2	20,132	2,4	4,3E-2	0,9231	0,551	0,087
3	22,391	34,9	4,2E-1	1,3826	0,787	1,269
4	25,981	2704,6	47,6	0,9461	0,905	98,312
5	29,892	5,1	5,7E-2	1,5025	1,82	0,187

	polimero (%)	dímero (%)	monómero (%)
Contenido	0,145	1,269	98,312

Fig. 12