

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 078**

51 Int. Cl.:

C07K 14/81 (2006.01)
C07K 14/76 (2006.01)
C07K 14/75 (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)
B01D 15/08 (2006.01)
B01D 15/20 (2006.01)
B01D 15/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2005 E 10184552 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2277912**

54 Título: **Aislamiento de proteínas del plasma**

30 Prioridad:

07.06.2004 DK 200400891
05.07.2004 DK 200401062

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.03.2017

73 Titular/es:

THERAPURE BIOPHARMA INC. (100.0%)
2585 Meadowpine Blvd
Mississauga ON L5N 8H9, CA

72 Inventor/es:

LIHME, ALLAN OTTO FOG

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 606 078 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aislamiento de proteínas del plasma

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al fraccionamiento y aislamiento a gran escala de proteína o proteínas de plasma humano, a partir de una solución proteínica. En particular, la presente invención se refiere a la fabricación a gran escala de proteína o proteínas de plasma terapéutico a partir de plasma humano, utilizando un adsorbente acoplado con un ligando para la captación de la proteína o proteínas, a partir de la solución proteínica.

Antecedentes de la técnica y técnica anterior

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

20 La sangre, el plasma sanguíneo y el suero sanguíneo son soluciones extremadamente complicadas que contienen proteínas que comprenden otros muchos tipos de compuestos distintos de la proteína o proteínas o enzima o enzimas de interés, todos cuidadosamente equilibrados y regulados para trabajar en el torrente sanguíneo en un intervalo muy amplio de funciones bioquímicamente complicadas tales como el transporte de oxígeno, la protección inmunológica y el sistema de coagulación que impide el excesivo sangrado de las heridas. Especialmente cuando se extrae sangre de un animal y se expone a la atmósfera y a la superficie de diferentes tipos de recipientes se vuelve muy inestable. Aunque se pueden añadir agentes químicos, como la heparina y el citrato de sodio, para aumentar la
25 estabilidad y, en cierto grado, impedir la coagulación del plasma sanguíneo obtenido al separar las células sanguíneas, el plasma seguirá siendo una solución proteínica muy frágil, muy concentrada y viscosa, que comprende también cantidades significativas de lípidos. A pesar de la adición de estabilizantes, cualquier manipulación o alteración de la composición de plasma implica el riesgo de desestabilización accidental, que puede causar la activación de la cascada de coagulación, precipitación de, p. ej., los componentes lipídicos, así como la desnaturalización de la proteína o proteínas diana y, de ese modo, se hace muy difícil trabajar con la sangre. Por
30 ello, cualquier procedimiento empleado para aislar proteínas a partir de la sangre o de soluciones derivadas de la sangre debe tener en cuenta la inestabilidad inherente de la solución y de las propias proteínas. Esto ha demostrado ser un reto muy importante para la producción a gran escala de productos terapéuticos a partir de la sangre.

35 Además, desde un punto de vista tecnológico, la complejidad e inestabilidad de la sangre hace que la separación y aislamiento de las proteínas de la sangre sea mucho más complicada y económicamente exigente que el aislamiento de proteínas de otros tipos de soluciones proteínicas tal como sobrenadantes de cultivos celulares de mamíferos y caldo de fermentación de microorganismos modificados genéticamente como los que se usan típicamente en la industria de la biotecnología. Además, la industria de la biotecnología normalmente solo aislará un producto específico a partir de un sobrenadante de un cultivo celular mientras que, por razones económicas y éticas, la
40 industria terapéutica de fraccionamiento de la sangre debe aislar generalmente tantos productos como sea posible de la cantidad limitada de sangre disponible.

45 El coste de la sangre, del suero y del plasma ha aumentado muy significativamente durante las últimas décadas siendo la principal razón debido al aumento del coste de las medidas de seguridad necesarias para impedir la propagación de enfermedades víricas desde los donantes de sangre hasta los receptores de los productos sanguíneos. Durante más de 10-20 años, el muy elevado coste del plasma sanguíneo, así como el aumento de los costes de implantación de etapas de eliminación vírica y otras medidas de seguridad durante el tratamiento han puesto a la industria de fraccionamiento de la sangre bajo una presión significativa para aumentar el rendimiento por litro de productos individuales tales como la inmunoglobulina G (IgG) y el inhibidor de la proteínasa alfa 1.

50 Existe, además, generalmente una fuerte necesidad de ampliar el número de productos que pueden ser producidos a partir de la misma cantidad de plasma, es decir, producir un aumento del número de las diferentes proteínas del plasma, siendo al mismo tiempo capaz de producir los productos existentes con rendimientos aceptables. La industria del fraccionamiento de la sangre ha experimentado que estas necesidades de hace mucho tiempo son difíciles de satisfacer con la tecnología conocida y aunque se han hecho intentos durante mucho tiempo por emplear técnicas de adsorción modernas como una alternativa a los procedimientos de precipitación establecidos todavía hay
55 problemas significativos en lo que respecta a la viabilidad económica y a la robustez del tratamiento de los procedimientos de adsorción descritos hasta ahora.

Uno de los procedimientos usados convencionalmente para el fraccionamiento de la proteína o proteínas del plasma sanguíneo o del suero sanguíneo se ha descrito en el documento US 2.390.074 (Cohn et al.) que describe un

procedimiento para el fraccionamiento de proteínas de plasma o de suero a gran escala que utiliza precipitación con etanol y regula la temperatura, el pH, la fuerza iónica y el tiempo para controlar la precipitación de ciertas proteínas del plasma humano. El procedimiento de fraccionamiento implica la adición escalonada de etanol a la materia prima del plasma con el fin de obtener varios precipitados (fracciones) y los correspondientes sobrenadantes que comprenden diferentes soluciones proteínicas enriquecidas.

Un inconveniente del procedimiento de precipitación con etanol, descrito por Cohn et al., es que algunas proteínas tienden a desnaturalizarse durante el procedimiento dando como resultado un menor rendimiento de la proteína a aislar y la contaminación con agregados que necesita que se eliminen antes de que se pueda obtener un producto terapéutico aceptable. Además, durante este procedimiento de fraccionamiento, las proteínas precipitadas tienen que ser resolubilizadas para su posterior tratamiento. Dichas soluciones de proteínas resolubilizadas pueden comprender niveles significativos de proteína insoluble (desnaturalizada) y material lipídico que hace que resulte difícil y consume tiempo trabajar el producto diana, lo que también contribuye significativamente a la pérdida de valor del producto. Además, es característico de este procedimiento que una proteína específica pueda distribuirse en varias de las fracciones obtenidas durante la adición escalonada de etanol, que de nuevo da como resultado un trabajo de bajos rendimientos y que conlleva mucho tiempo de las fracciones proteínicas recombinadas.

En el fraccionamiento de, p. ej., inhibidor de la proteinasa alfa 1 o inmunoglobulinas, tal como la IgG, utilizando el procedimiento de fraccionamiento descrito por Cohn et al., el rendimiento del inhibidor de la proteinasa alfa 1 es tan bajo como 10-20% y el rendimiento de la IgG es tan bajo como 40-50%. Sin embargo, puesto que estos productos son muy necesarios y como existe un subabastecimiento del producto para satisfacer las necesidades de los pacientes, para aislar tales productos son muy necesarios nuevos procedimientos donde es menor la pérdida de producto.

Durante la última década se han hecho muchos intentos para desarrollar un procedimiento de fraccionamiento que puede proporcionar un aumento del rendimiento utilizando una gama de otras técnicas, incluida la cromatografía. Sin embargo, inconvenientes asociados con las técnicas de adsorción conocidas, tales como caudales bajos y bajas capacidades de unión dan como resultado baja productividad, así como falta de robustez y dificultades en la aplicación de procedimientos de limpieza seguros han dificultado el equilibrio del rendimiento y de la economía implicados en el fraccionamiento de las proteínas del plasma y del suero sanguíneos. El núcleo de los procedimientos de fabricación industriales existentes, se basa, por lo tanto, todavía, en el trabajo de Cohn et al.

Los procedimientos de aislamiento y purificación utilizados actualmente han mostrado que son inadecuados y las impurezas traza resultantes de procedimientos de purificación ineficientes pueden estimular una respuesta inmune en los pacientes. Además, los procedimientos de purificación que no separan la parte activa e inactiva del producto, como los procedimientos actualmente utilizados, pueden conducir a un producto con una eficacia impredecible y una actividad específica que varía entre lotes independientes.

Incluso los intentos de desarrollar técnicas avanzadas de adsorción, tal como la adsorción en lecho expandido, que se introdujeron por primera vez a principios de los años noventa, no han logrado mejorar el empleo de las técnicas de adsorción. Finette G. M. S. et al., *Biotechnol. Prog.*, 1998, 14, pág. 286-293, describe así la aplicación de un adsorbente que tiene un diámetro medio de partícula de 180 micrómetros y una densidad de 1,79 g/ml para adsorción en lecho empaquetado y en lecho expandido del inhibidor de proteinasa alfa 1 a partir de la fracción II+III de Cohn. Los autores concluyen que un caudal volumétrico de 0,2 ml/min (correspondiente a un caudal lineal de 0,1 cm/min o 60 cm/hora) dará como resultado un rendimiento del inhibidor de la proteinasa alfa 1 del 50%. Los autores afirman además que caudales más altos disminuirán el rendimiento así como perturbarán el flujo en pistón en la columna. Tales bajos caudales no son económicamente interesantes y no es aconsejable, por lo tanto, el uso de, p. ej., adsorción en lecho expandido para el fraccionamiento industrial de proteínas sanguíneas.

Otros intentos de aplicar adsorción en lecho expandido para el aislamiento de proteínas en plasma humano confirman los bajos caudales aplicados con técnicas anteriores. El documento US 6.617.133 describe, por ello, el uso de un adsorbente Streamline SP (Amersham Biosciences) que, según el proveedor, tiene un diámetro de la partícula de volumen medio de 200 micras y una densidad de 1,20 g/ml para el aislamiento de seroalbúmina humana utilizando un caudal de aplicación de la materia prima de 100 cm/hora. Un bajo caudal de este tipo está limitando la productividad del sistema de adsorción y, por ello, requiere columnas muy grandes y da como resultado un alto coste de materiales por unidad de albúmina humana producida.

El documento WO 02/096215 divulga un procedimiento a gran escala para el aislamiento de proteínas, que incluye seroalbúmina o inmunoglobulinas bovinas, a partir de una solución proteínica, cuyo procedimiento comprende las etapas de ajustar el pH de la mezcla, aplicar la mezcla a una columna de adsorción de lecho expandido que comprende un adsorbente de alta densidad, lavar la columna y eluir la proteína desde el adsorbente. Las soluciones proteínicas a las que se aplica este procedimiento son soluciones derivadas de la leche y soluciones derivadas del pescado.

El documento WO 99/65586 divulga el uso de procedimientos de adsorción de lecho expandido para el aislamiento de proteínas a partir de una gama completa de extractos y materias primas.

Burnouf (J. Chromatography. B, 664 (1995) 2-5) es un artículo de revisión interesado en las formas en que se ha utilizado el fraccionamiento cromatográfico en el fraccionamiento del plasma.

En consecuencia, un procedimiento para el fraccionamiento de proteínas del plasma que es rápido, robusto (es decir, que es fiable durante el funcionamiento diario con un tiempo de inactividad reducido), específico y seguro, y que al mismo tiempo proporciona un rendimiento y una pureza mejorados de los productos de interés durante el tratamiento y, de ese modo, facilita un equilibrio mejorado y aceptable entre rendimiento y economía, en comparación con los procedimientos utilizados convencionalmente, p. ej., el procedimiento descrito por Cohn et al., y que resuelve los problemas antes mencionados siendo, por lo tanto, deseado. Un procedimiento de este tipo se proporciona en el presente documento.

10 Sumario de la invención

En consecuencia, la presente invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento de una o más proteínas humanas a partir de una solución proteínica. El procedimiento de la presente invención es rápido, robusto, específico y seguro, y proporciona un rendimiento y una pureza mejorados del producto de interés durante el tratamiento y, de este modo, facilita un mejorado y aceptable equilibrio entre el rendimiento del producto y la economía involucrada, en comparación con los procedimientos utilizados convencionalmente. El procedimiento según la invención es particularmente adecuado para la producción a gran escala.

Por ello, un aspecto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para el aislamiento de una o más proteínas humanas a partir de una solución proteínica en donde la solución proteínica se obtiene a partir de plasma humano y contiene etanol y se selecciona del grupo que consiste en sobrenadante I, sobrenadante II + III, sobrenadante I + II + III, fracción resolubilizada II + III, fracción resolubilizada IV-1, y cualquier combinación de los mismos. El procedimiento comprende las etapas de:

a) ajustar el pH de la solución proteínica a un pH preestablecido;

b) ajustar la fuerza iónica de la solución proteínica a una fuerza iónica preestablecida;

c) aplicar dicha solución proteínica a una columna de adsorción de lecho expandido que comprende partículas adsorbentes de alta densidad que tienen una densidad de 1,5 g/ml a 15 g/ml, y en donde el 85% en volumen de las partículas adsorbentes de alta densidad tienen un tamaño de partícula en el intervalo de 10 a 150 μm ;

d) lavar la columna con un tampón de lavado para lavar el material no unido;

e) lavar la columna con un tampón de elución para eluir una o más proteínas humanas del adsorbente;

en donde el caudal lineal de líquido a través de la columna es de al menos 2 cm/min. Preferiblemente, el sobrenadante o la fracción precipitada tienen una concentración de alcohol de al menos 5% en volumen.

Preferiblemente, el adsorbente comprende un polímero matriz funcionalizado que lleva una pluralidad de grupos funcionales unidos de forma covalente que comprenden un sistema de anillo aromático o heteroaromático y uno o más grupos ácidos.

Preferiblemente, dichas una o más proteínas de la sangre humana se seleccionan del grupo que consiste en albúmina, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, inhibidor de la proteinasa alfa 1, proteína de procoagulación de la sangre, proteína de anticoagulación de la sangre, agente trombolítico, proteína anti-angiogénica, α -2-antiplasmina, inhibidor de la esterasa C-1, apolipoproteína, HDL, LDL, Fibronectina, beta-2-glicoproteína I, fibrinógeno 30, plasminógeno, plasmina, activador del plasminógeno, inhibidor del plasminógeno, estreptocinasa, inhibidor de interalfa-tripsina, α -2-macroglobulina, proteína amiloide, ferritina, prealbúmina, globulina GC, hemopexina, complemento C3, transferrina, urocina y glicoproteína α -1 ácida.

Preferiblemente, una o más proteínas se retiran por lavado como una proteína no unida con uno o más tampones de lavado. Preferiblemente, la proteína no unida comprende el inhibidor de la proteinasa α -1.

Preferiblemente, el pH preestablecido está en el intervalo de pH 3,0 a pH 10,0 y/o la fuerza iónica presente está en el intervalo de 0,0001 a 12,0.

Preferiblemente, el adsorbente tiene una capacidad de unión dinámica a 10% de saturación para al menos una proteína específica de al menos 5 g por litro de adsorbente sedimentado.

Preferiblemente, la albúmina y la IgG están unidas al adsorbente y simultáneamente el inhibidor de la proteinasa α -1 se obtiene como material no unido desde el adsorbente.

Preferiblemente, albúmina e IgG se obtienen del adsorbente por elución escalonada.

Descripción detallada de la invención

5 Durante la última década el desarrollo de la adsorción en lecho expandido ha ganado cada vez más atención debido a la gran aplicabilidad para la purificación a gran escala. Las proteínas se pueden purificar a partir de una solución proteínica en bruto sin la necesidad de clarificación individual, concentración y otros tipos de purificación inicial para eliminar la materia en partículas. Los adsorbentes, utilizados en la adsorción en lecho expandido, captan las moléculas diana utilizando los mismos principios de la cromatografía de afinidad, de intercambio iónico o de interacción hidrófoba.

10 El concepto básico y la técnica anterior en el campo de la adsorción en lecho expandido se ha descrito en, p. ej., los documentos EP 0 722 771, WO 01/85329, WO 92/18237, WO 2000/25884, WO 02/05923, WO 99/65586 y WO 00/57982, que divulgan diferentes tipos de aparatos y equipos de adsorción en lecho expandido, así como diferentes tipos de partículas de adsorción que han encontrado los autores de la presente invención para adaptarse adecuadamente o desarrollarse adicionalmente para el aislamiento de proteínas del plasma como se describe en la presente invención.

15 En una realización de la presente invención, el procedimiento según la presente invención se puede realizar a gran escala. En el presente contexto, la expresión "a gran escala" se refiere al tratamiento de un volumen de materia prima de al menos 1 litro por ciclo de adsorción, tal como al menos 5 litros por ciclo de adsorción, tal como al menos 10 litros por ciclo de adsorción, tal como al menos 25 litros por ciclo de adsorción, tal como al menos 100 litros por ciclo de adsorción, tal como al menos 1.000 litros por ciclo de adsorción y, de ese modo, distinguir la invención de cualquier experimento analítico y de pequeña escala que no esté relacionado con los exigentes requisitos de robustez y reproducibilidad de un entorno industrial de producción a gran escala.

La solución proteínica

25 Según la presente invención, la proteína o proteínas de interés son aisladas de una solución proteínica. En el presente contexto, la expresión "solución proteínica" se refiere a cualquier tipo de solución en forma líquida que comprenda la proteína o proteínas de interés y a partir de las cuales se puedan separar y aislar la proteína o proteínas. En la presente invención, la solución proteínica se obtiene a partir de plasma humano.

En la presente invención, la solución proteínica utilizada se complementa con un alcohol que es etanol.

30 En el presente contexto, la expresión "complementado con un alcohol" se refiere a la adición de un alcohol a la solución proteínica con el fin de lograr la separación de al menos dos componentes presentes en la solución proteínica en la que un componente llegará a estar presente en un sobrenadante y el otro componente llegará a estar presente en una fracción. En particular, dicha separación de la solución proteínica implica aumentar gradualmente la cantidad de alcohol añadido a la solución proteínica y, de ese modo, separar al menos una proteína del suero o plasma de la solución proteínica. En el transcurso del procedimiento de separación, la proteína o proteínas de interés pueden estar presentes bien en el sobrenadante o bien en la fracción. En una realización de la presente invención, la solución proteínica se complementa con un alcohol para comprender al menos 0,1% en vol. de un alcohol, p. ej., al menos 0,5% en vol., tal como al menos 0,75% en vol., p. ej., al menos 1,0% en vol., tal como al menos 1,5% en vol., p. ej., al menos 2,0% en vol., tal como al menos 3,0% en vol., p. ej., al menos 5,0% en vol., tal como al menos 7,5% en vol., p. ej., al menos 10,0% en vol., tal como al menos 20% en vol., p. ej., al menos 25,0% en vol., tal como al menos 40% en vol., p. ej., al menos 50,0% en vol., tal como al menos 60% en vol., p. ej., al menos 75,0% en vol.

40 Aún en una realización de la presente invención, la solución proteínica tiene un contenido total en alcohol de al menos 0,1% en vol., p. ej., al menos 0,5% en vol., tal como al menos 0,75% en vol., p. ej., al menos 1,0% en vol., tal como al menos 1,5% en vol., p. ej., al menos 2,0% en vol., tal como al menos 3,0% en vol., p. ej., al menos 5,0% en vol., tal como al menos 7,5% en vol., p. ej., al menos 10,0% en vol., tal como al menos 20% en vol., p. ej., al menos 25,0% en vol., tal como al menos 40% en vol., p. ej., al menos 50,0% en vol., tal como al menos 60% en vol., p. ej., al menos 75,0% en vol., tal como al menos 77% en vol.

En el presente contexto, el término "sobrenadante" se refiere a una fase líquida, que está situada por encima de una fracción líquida, una fracción de sedimento o una fracción precipitada obtenida por la adición de un alcohol a la solución proteínica, según la presente invención.

50 En el presente contexto, el término "fracción" se refiere a una parte de la solución proteínica que se puede separar del sobrenadante mediante un procedimiento de fraccionamiento, tal como filtración, microfiltración, centrifugación, destilación o cromatografía y la fracción puede ser una combinación de compuestos o un compuesto puro. En una realización de la presente invención, la fracción puede estar en forma de un líquido (una fracción líquida), un sedimento (una fracción de sedimento) o un precipitado (una fracción precipitada).

En la presente invención, la solución proteínica se complementa con etanol.

55 En la presente invención, la solución proteínica comprende fracción o fracciones de plasma y/o sobrenadante o sobrenadantes en el plasma de un ser humano.

Además, en una realización de la presente invención, las fracciones obtenidas a partir de un precipitado resolubilizado pueden obtenerse por la adición gradual de alcohol a la solución proteínica. En particular, se puede proporcionar una fracción de plasma a partir de un precipitado resolubilizado obtenido mediante la adición de alcohol al plasma.

5 Según la presente invención, una solución proteínica puede comprender la combinación de uno o más sobrenadante o sobrenadantes y/o una o más fracciones resolubilizadas. En particular, una solución proteínica de plasma humano se puede obtener por recombinación de uno o más sobrenadantes y/o uno o más precipitados resolubilizados obtenidos por la adición de alcohol al plasma humano.

10 En una realización de la presente invención, la temperatura de la solución proteínica puede estar en el intervalo desde -5 hasta 50 °C, más preferiblemente en el intervalo de -5 a 40 °C, todavía más preferiblemente en el intervalo de -5 a 30 °C, todavía más preferiblemente en el intervalo de -5 a 20 °C, todavía más preferiblemente en el intervalo desde 0 a 10 °C o en el intervalo de 0 a 50 °C, más preferiblemente en el intervalo de 10 a 50 °C, todavía más preferiblemente en el intervalo de 20 a 50 °C, todavía más preferiblemente en el intervalo de 30 a 50 °C, todavía más preferiblemente en el intervalo de 40 a 50 °C.

15 El procedimiento de fraccionamiento/separación

Como se ha mencionado anteriormente, la forma convencional de fraccionar las soluciones proteínicas implica el procedimiento descrito por Cohn et al., que implica la adición escalonada de alcohol a la solución proteínica en el que la proteína o proteínas de interés son separadas gradualmente de la solución proteínica. Este procedimiento se ha descrito con más detalle en: Cohn et al., "Separation into Fractions of Protein and Lipoprotein Components" J. Am. Chem. Soc, 68, 459-475, 1946; E. J. Cohn et al., Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins, IV, A System for Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids, The Journal of the American Chemical Society, vol. LXVIII (Enero-Julio 1946), pág. 459-475; US 2.390.074 y US 2.469.193.

20 En el presente contexto, los términos "fraccionamiento" y "separación" se usan indistintamente y se relacionan con el procedimiento de preparación de la solución proteínica antes de ponerse en contacto con el adsorbente para el aislamiento de la proteína o proteínas de interés.

En una realización de la presente invención, un fraccionamiento escalonado de soluciones proteínicas por la adición de alcohol para obtener proteína o proteínas se puede ilustrar mediante una o más de las siguientes operaciones:

30 (i) El plasma puede congelarse inicialmente y después someterse a un procedimiento lento de descongelación controlada, en el que se forma un crioprecipitado que comprende Factor VIII (complejado con el factor de von Willebrand, vWF) y fibrinógeno, y un sobrenadante que comprende la mayor parte de las proteínas que permanecen en el plasma (denominado plasma cryo-poor).

35 (ii) La fracción de crioprecipitado obtenida en (i) se puede resolubilizar para formar una solución proteínica y la proteína o proteínas se pueden aislar poniéndola en contacto con un adsorbente. En particular, la proteína o proteínas, tal como el Factor VIII, el vWF y el fibrinógeno, se pueden aislar de la solución proteínica obtenida a partir de la fracción resolubilizada.

(iii) El sobrenadante de (i), plasma cryo-poor, se complementa con alcohol y fracción I (un precipitado) y se forma el sobrenadante I.

40 (iv) El sobrenadante I se puede complementar con más alcohol, y se forman la fracción II + III precipitada y el sobrenadante II + III. La fracción II + III se puede separar y resolubilizar para formar una solución proteínica y la proteína o proteínas de interés se pueden aislar poniéndolas en contacto con un adsorbente. En particular, proteína o proteínas como las inmunoglobulinas (tal como IgG) se pueden aislar de la solución proteínica obtenida de las fracciones II + III. El sobrenadante II + III comprenderá principalmente albúmina e inhibidor de la proteinasa alfa 1.

45 (v) El sobrenadante II + III se puede complementar adicionalmente con alcohol y formar el sobrenadante IV-1 y la fracción IV-1 precipitada. La fracción IV-1 se puede separar y resolubilizar y formar una solución proteínica y la proteína o proteínas se pueden aislar poniéndolas en contacto con un adsorbente. En particular, la proteína o proteínas del plasma tales como el inhibidor de la proteinasa alfa 1, la antitrombina III y el complejo del Factor IX se pueden aislar de la solución proteínica obtenida de la fracción IV-1.

50 (vi) El sobrenadante IV-1 se puede complementar con más alcohol para formar la fracción precipitada IV-4 y el sobrenadante IV-4. La fracción IV-4 se puede separar y resolubilizar para formar una solución proteínica y la proteína o proteínas de interés se pueden aislar poniéndolas en contacto con un adsorbente. En particular, la Butirilcolinesterasa se puede aislar de la solución proteínica obtenida de la fracción IV-4.

55 (vii) El sobrenadante VI-4 se puede complementar adicionalmente con alcohol para proporcionar la fracción V precipitada que se puede separar y resolubilizar para formar una solución proteínica y la proteína o proteínas de interés se pueden aislar poniéndolas en contacto con un adsorbente. En particular, la albúmina se puede aislar a

partir de la solución proteínica obtenida de la fracción V.

En la presente invención, la solución proteínica se selecciona del grupo que consiste en sobrenadante I, sobrenadante II + III, sobrenadante I + II + III, fracción resolubilizada II + III, fracción resolubilizada IV-1, fracción resolubilizada IV-4, fracción resolubilizada V y cualquier combinación de la misma.

- 5 En una realización particular de la presente invención, la solución proteínica se puede seleccionar del grupo que consiste en sobrenadante I, sobrenadante II + III, fracción resolubilizada IV-1, y cualquier combinación de los mismos.

10 Aún en una realización particular de la presente invención, la solución proteínica puede seleccionarse del grupo que consiste en sobrenadante I, sobrenadante II + III, sobrenadante I + II + III, y fracción resolubilizada IV-1, y cualquier combinación de los mismos.

En una realización particular adicional de la presente invención, la solución proteínica se puede seleccionar del grupo del sobrenadante I y la fracción resolubilizada II + III.

15 Las fracciones precipitadas se pueden resolubilizar en una amplia gama de soluciones acuosas que incluyen agua pura. En muchas realizaciones preferidas, el medio de resolubilización será un tampón acuoso que tiene un pH y una fuerza iónica adecuados para la siguiente etapa de tratamiento aguas abajo, p. ej., una etapa de adsorción según la invención.

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

20 En una realización de la presente invención, la solución proteínica se puede obtener mediante el procedimiento de fraccionamiento de Cohn et al., descrito por Cohn et al., "Separation into Fractions of Protein and Lipoprotein Components" J. Am. Chem. Soc, 68, 459-475, 1946; E. J. Cohn et al., Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins, IV, A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids, The Journal of the American Chemical Society, vol. LXVIII (Enero-Julio 1946), pág. 459-475; US 2.390.074 y US 2.469.193.

25 En una realización de la presente invención, la solución proteínica comprende al menos una proteína del plasma humano obtenida a partir del fraccionamiento del plasma por adición de etanol, p. ej., el procedimiento original de fraccionamiento de Cohn o variantes del mismo, tales como el procedimiento de Cohn-Oncley.

La proteína

30 En la presente invención, una o más de las proteínas a aislar es una o más de las proteínas del plasma humano. En el presente contexto, la expresión "proteína o proteínas de plasma" se refiere a una proteína o proteínas que son producidas o requeridas por el cuerpo humano.

35 El plasma es un componente de la sangre. Es el líquido en el que las células sanguíneas están en suspensión. El plasma sanguíneo contiene proteínas, lípidos, nutrientes, productos finales metabólicos, hormonas y electrolitos inorgánicos. El plasma sanguíneo es estabilizado normalmente mediante la adición de anticoagulantes tales como citrato de sodio, heparina y AEDT.

40 En una realización de la presente invención, una o más proteína o proteínas del plasma humanas que se aislarán se seleccionan del grupo que consiste en albúmina, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, inhibidor de la proteinasa alfa 1 (igual que α -1-antitripsina), proteína procoagulante sanguínea, proteína anticoagulante sanguínea, agente trombolítico, proteína anti-angiogénica, α -2-antiplasmina, inhibidor de esterasa C-1, apolipoproteína, HDL, LDL, Fibronectina, beta-2-glicoproteína I, fibrinógeno, plasminógeno, plasmina, activador del plasminógeno, inhibidor del plasminógeno, inhibidor de la proteasa del plasma, anti-trombina III, estreptocinasa, inhibidor de la inter-alfa-tripsina, α -2-macroglobulina, proteína amiloide, ferritina, pre-albúmina, globulina GC, hemopexina, complemento C3, transferrina, urocinasa, glicoproteína α -1 ácida y el factor o factores coagulantes o anti-coagulantes tal como Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, factor de von Willebrand, complejo de Factor VIII-factor de von Willebrand, Factor IX, Factor X, Factor XI, inhibidor C1, proteína C y/o Proteína S.

La columna

45 El adsorbente capaz de capturar una o más proteína o proteínas se mantiene dentro de una columna. En el presente contexto, el término "columna" se refiere a cualquier tipo de recipiente que pueda ser suministrado con al menos una entrada y al menos una salida para la aplicación de la solución proteínica a la columna y después eluir la proteína. La entrada y la salida, para ciertas columnas, pueden ser la misma (por ejemplo, para los tanques de adsorción por lotes). La columna está en forma de una columna de adsorción en lecho expandido (EBA). La columna de adsorbente se puede usar en un sistema por lotes o en un sistema continuo. Normalmente, las columnas de adsorción de lecho expandido operan bajo condiciones de flujo en pistón (es decir, no hay mezclado posterior ni turbulencia del líquido en el lecho adsorbente).

El hecho de que la tecnología EBA, en general, pueda trabajar eficientemente con una solución proteínica no clarificada la hace interesante para el aislamiento de proteínas. En comparación con los procedimientos basados en técnicas de adsorción en lecho empacado, el EBA puede ofrecer un procedimiento robusto que comprende menos etapas y, por ello, da como resultado un aumento de los rendimientos y una mayor economía del procedimiento. Debido a la expansión del lecho adsorbente durante la ejecución de un procedimiento de EBA, las columnas de EBA pueden además ser ampliadas hasta escala industrial sin ningún tipo de consideraciones significativas respecto al aumento de las contrapresiones o ruptura del procedimiento debido al atasco del sistema que a menudo es un problema cuando se utilizan columnas de lecho empaquetado.

Según la presente invención, la solución proteínica se aplica a una columna de lecho expandido que comprende un adsorbente.

En el presente contexto, la expresión "lecho expandido" se refiere a la situación en donde las partículas adsorbentes se emplean en columnas que permiten que el adsorbente se expanda con un flujo ascendente de líquido a través de la columna. La columna se diseñará para evitar una excesiva mezcla y turbulencia del líquido en la columna al tiempo que las partículas adsorbentes individuales se mantienen en un estado dinámico, no fijo, moviéndose sólo en estrecha una zona local en la columna. Aunque los lechos expandidos preferidos tienen una pequeña zona de mezclado en la parte inferior de la columna en la que se distribuye el líquido entrante en toda la sección transversal de la columna, los lechos expandidos generalmente operan bajo condiciones de flujo en pistón en similitud con los lechos empaquetados.

En la presente invención, el adsorbente se mantiene en una columna de adsorción en lecho expandido y se usa preferiblemente para el aislamiento a gran escala de una o más proteínas a partir de una solución proteínica.

El adsorbente

Un objeto adicional de esta invención es proporcionar un procedimiento para el aislamiento de proteína o proteínas a partir de una solución proteínica basada en la adsorción a un material en fase sólida por adsorción en lecho expandido (EBA). Además, la adsorción puede ser caracterizada por el uso de características adsorbentes selectivas y/o química de ligandos que permite la unión específica y la posterior elución de sustancialmente una única sustancia biomolecular, o que permite alternativamente una unión específica de grupo de unas pocas sustancias biomoleculares seguida por una elución selectiva y consecutiva de una o más sustancias desde el adsorbente.

El adsorbente comprende un ligando adecuado para unirse a una o más de las proteínas de interés. En una realización de la presente invención, el adsorbente se puede lavar y/o equilibrar opcionalmente con uno o más tampones de lavado y/o tampones de equilibrado.

En la presente invención es de importancia crítica que el adsorbente sea una partícula que tenga características combinadas en lo que respecta a tamaño y densidad. Así, se ha encontrado que para soluciones proteínicas muy concentradas, tales como plasma o suero, es muy deseable emplear partículas que tengan un diámetro de la partícula de volumen medio menor de 150 μm con el fin de obtener una rápida y eficaz unión a la proteína (que es importante para la productividad, y por ello la economía, de una planta de producción). Sin embargo, se ha encontrado además que es la combinación del pequeño diámetro de las partículas adsorbentes (menores de 150 μm) con una cierta densidad mínima (mayor de 1,5 g/ml) de las partículas adsorbentes lo que permite mejoras significativas en la productividad de la planta de producción. Por esto, se consigue una combinación única de unión rápida y eficaz a proteínas con altos caudales de líquido a través de las columnas empleadas para que pueda lograrse el procedimiento de adsorción. Particularmente para columnas de lecho expandido, los altos caudales de líquido que se pueden obtener con los adsorbentes según la invención pueden ser significativos. Generalmente se encuentra que un diámetro más pequeño del volumen medio de las partículas puede desear una mayor densidad de las partículas.

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

- FastLine UFC NNSDW, UpFront Chromatography A/S, Dinamarca, que tiene un diámetro de partículas de volumen medio de 70 μm y una densidad de 2,9 g/ml.
- STREAMLINE Direct CST-1, Amersham Biosciences, Suecia, que tiene un diámetro de partículas de volumen medio de 135 μm y una densidad de 1,8 g/ml.
- Adsorbentes de intercambio iónico Q y CM HyperZ, Biosepra SA, Francia, que tienen un diámetro de partículas de volumen medio de 75 μm y una densidad de 3,2 g/ml.

Específicamente, en la adsorción en lecho expandido, el caudal, el tamaño de las partículas y la densidad de las partículas pueden tener influencia sobre la expansión del lecho expandido y es importante controlar el grado de expansión de tal manera que se mantengan las partículas dentro de la columna cuando se trabaja con adsorción de lecho expandido. Para aplicabilidad industrial puede ser de interés tener un caudal elevado y una baja expansión. El

grado de expansión puede determinarse como H/H_0 , donde H_0 es la altura del lecho en modo de lecho empaquetado (sin flujo a través de la columna) y H es la altura del lecho en modo expandido (con un flujo determinado a través de la columna). En una realización de la presente invención, el grado de expansión H/H_0 está en el intervalo de 1,1-6, tal como 1,1-5, p. ej., 1,1-4, tal como 1,2-5, p. ej., 1,5-4 tal como 2-4, tal como 2-3, tal como 3-4. En otra realización de la presente invención, el grado de expansión H/H_0 es a lo sumo 1,2, p. ej., a lo sumo 1,3, tal como a lo sumo 1,5, p. ej., a lo sumo 1,8 tal como a lo sumo 2, tal como a lo sumo 2,5, p. ej., a lo sumo 3, tal como a lo sumo 3,5, p. ej., de 4, tal como a lo sumo 4,5. En aún una realización de la presente invención, el caudal es de 5 cm/min y el grado de expansión H/H_0 es a lo sumo 1,2, p. ej., a lo sumo 1,3, tal como a lo sumo 1,5, p. ej., a lo sumo 1,8 tal como a lo sumo 2, tal como a lo sumo 2,5, p. ej., a lo sumo 3, tal como a lo sumo 3,5, p. ej., de 4, tal como a lo sumo 4,5. En una realización adicional de la presente invención, el caudal es de 7 cm/min y el grado de expansión H/H_0 es a lo sumo 1,2, p. ej., a lo sumo 1,3, tal como a lo sumo 1,5, p. ej., a lo sumo 1,8 tal como a lo sumo 2, tal como a lo sumo 2,5, p. ej., a lo sumo 3, tal como a lo sumo 3,5, p. ej., de 4, tal como a lo sumo 4,5. Todavía en una realización de la presente invención, el caudal es de 10 cm/min y el grado de expansión H/H_0 es a lo sumo 1,2, p. ej., a lo sumo 1,3, tal como a lo sumo 1,5, p. ej., a lo sumo 1,8, tal como a lo sumo 2, tal como a lo sumo 2,5, p. ej., a lo sumo 3, tal como a lo sumo 3,5, p. ej., de 4, tal como a lo sumo 4,5. En aún una realización de la presente invención, el caudal es de 15 cm/min y el grado de expansión H/H_0 es a lo sumo 1,2, p. ej., a lo sumo 1,3, tal como a lo sumo 1,5, p. ej., a lo sumo 1,8, tal como a lo sumo 2, tal como a lo sumo 2,5, p. ej., a lo sumo 3, tal como a lo sumo 3,5, p. ej., de 4, tal como a lo sumo 4,5. Todavía en una realización de la presente invención, el caudal es de 20 cm/min y el grado de expansión H/H_0 es a lo sumo 1,2, p. ej., a lo sumo 1,3, tal como a lo sumo 1,5, p. ej., a lo sumo 1,8, tal como a lo sumo 2, tal como a lo sumo 2,5, p. ej., a lo sumo 3, tal como a lo sumo 3,5, p. ej., de 4, tal como a lo sumo 4,5.

En la presente invención, el caudal lineal de la columna de lecho expandido es de al menos 2 cm/min, preferiblemente al menos 3 cm/min, más preferiblemente al menos 4 cm/min, todavía más preferiblemente al menos 5 cm/min, todavía más preferiblemente al menos 6 cm/min, todavía más preferiblemente al menos 7 cm/min, todavía más preferiblemente al menos 8 cm/min, todavía más preferiblemente al menos 10 cm/min, todavía más preferiblemente al menos 12 cm/min, todavía más preferiblemente al menos 15 cm/min, todavía más preferiblemente al menos 20 cm/min, todavía más preferiblemente al menos 25 cm/min, todavía más preferiblemente al menos 30 cm/min, todavía más preferiblemente al menos 40 cm/min, todavía más preferiblemente al menos 50 cm/min. Todavía en una realización de la presente invención, el caudal lineal está en el intervalo de 2-75 cm/min, p. ej., 5-75 cm/min, tal como 7-75 cm/min, p. ej., 10-75 cm/min, tal como 15-75 cm/min, p. ej., 20-75 cm/min, tal como 30-75 cm/min, p. ej., 40-75 cm/min, tal como 50-75 cm/min, tal como 2-50 cm/min, p. ej., 2-30 cm/min, tal como 3-30 cm/min, tal como 3-20 cm/min, tal como 3-15 cm/min, tal como 4-30 cm/min, tal como 4-25 cm/min, tal como 4-20 cm/min, tal como 4-15 cm/min, tal como 5-25 cm/min, p. ej., 5-15 cm/min, tal como 5-10 cm/min, p. ej., 5-7,5 cm/min, tal como 7,5 cm/min. Estos mayores caudales, en comparación con los caudales convencionales utilizados, pueden ser en gran medida posibles debido al pequeño diámetro de partícula en combinación con la alta densidad del adsorbente. En realizaciones particulares de la presente invención, la aplicación de la solución proteínica a la columna de adsorbente puede realizarse con un caudal lineal de al menos 200 cm/hora, tal como al menos 300 cm/hora, más preferiblemente al menos 400 cm/hora, tal como al menos 500 o 600 cm/hora, tal como al menos el 900 cm/hora.

En la presente invención, la columna comprende un adsorbente de alta densidad. En el presente contexto, la expresión "adsorbente de alta densidad" se refiere a parte del grupo de adsorbentes e implica todo el lecho de partículas adsorbentes presentes en la columna de adsorbente. La expresión "partícula adsorbente" se utiliza indistintamente con el término "partícula" y se refiere a las partículas simples individuales que constituyen el adsorbente en la columna. La forma preferida de una sola partícula adsorbente es sustancialmente esférica. La forma global de las partículas no es, sin embargo, normalmente, extremadamente crítica, por ello, las partículas pueden tener otros tipos de formas redondeadas, p. ej., forma de elipsoide, de gota y de grano. Sin embargo, para ciertas aplicaciones (por ejemplo, cuando las partículas se usan en una disposición de lecho fluidizado), puede preferirse que al menos el 95% de las partículas sean sustancialmente esféricas. En el presente contexto, las expresiones "diámetro de partícula" y "tamaño de partícula" se usan indistintamente y se refieren al diámetro de un círculo que puede hacerse alrededor de la partícula y, por lo tanto, puede ser considerado como el diámetro de la partícula en la parte más ancha de la partícula.

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

En la presente invención, la densidad de la partícula adsorbente está en el intervalo de 1,5 g/ml a 15 g/ml, adecuadamente en el intervalo de 4 g/ml a 15 g/ml, o en el intervalo de 4 g/ml a 10 g/ml.

La densidad de la partícula adsorbente en la EBA es significativa para los caudales aplicables en relación con el

grado máximo de expansión posible del lecho adsorbente dentro de una típica columna de EBA (por ejemplo, con H/H_0 máx. 3-5) y es al menos 1,5 g/ml, preferiblemente al menos 1,8 g/ml, más preferiblemente al menos 1,9 g/ml, incluso más preferiblemente al menos 2,0 g/ml, todavía más preferiblemente al menos 2,1 g/ml, lo más preferiblemente al menos 2,3 g/ml, incluso más preferiblemente al menos 2,5 g/ml, incluso más preferiblemente al menos 2,8 g/ml, incluso más preferiblemente al menos 2,9 g/ml, todavía más preferiblemente al menos 3,0 g/ml, todavía más preferiblemente al menos 3,5 g/ml con el fin de permitir una alta productividad del procedimiento.

En la presente invención, el 85% en volumen de las partículas individuales del adsorbente tienen un diámetro dentro del intervalo de 10 a 150 micrómetros, preferiblemente dentro del intervalo de 15 a 120 micrómetros, todavía más preferiblemente dentro del intervalo de 20 a 100 micrómetros, todavía más preferiblemente dentro del intervalo de 20 a 80 micrómetros, todavía más preferiblemente dentro del intervalo de 80 a 150 micrómetros, e incluso todavía más preferiblemente dentro del intervalo de 40 a 120 micrómetros. Aún en una realización de la presente invención, el diámetro medio de partícula adsorbente puede ser de 150 micrómetros o menos, preferiblemente de 120 micrómetros o menos, incluso más preferiblemente de 100 micrómetros o menos, todavía más preferiblemente de 80 micrómetros o menos, todavía más preferiblemente de 70 micrómetros o menos, todavía más preferiblemente de 60 micrómetros o menos, todavía más preferiblemente de 50 micrómetros o menos, todavía más preferiblemente de 40 micrómetros o menos.

En un procedimiento de EBA se pueden aplicar varios parámetros que influyen en el caudal. Las propiedades de fluidización de las partículas adsorbentes (que se pueden describir con la ayuda de la Ley de Stokes) determinan qué caudales se pueden aplicar para expandir el adsorbente y que se mantenga el adsorbente todavía dentro de la columna. Los principales factores que influyen en ello son el diámetro y la densidad de las partículas adsorbentes en combinación con la viscosidad del líquido que fluye a través de la columna. Sin embargo, las cinéticas de unión y de transferencia de masas de utilidad para una aplicación específica son igualmente importantes para asegurar la eficiencia y productividad óptimas del procedimiento de EBA. Por ejemplo, puede ser posible hacer funcionar una columna de EBA que contenga un determinado adsorbente de EBA a caudales muy altos en lo que respecta a las propiedades físicas de fluidización y expansión, mientras que el alto caudal aplicado da como resultado una adsorción pobre e ineficaz (es decir, una baja capacidad dinámica) debido al hecho de que las moléculas diana que se unirán no pueden difundirse dentro y fuera de las partículas adsorbentes que igualan este caudal (es decir, el factor limitante es la cinética de transferencia de masas).

Por consiguiente, en una combinación de realizaciones de la invención particularmente preferidas, donde el caudal lineal aplicado durante la aplicación de la solución proteínica es superior a 300 cm/hora, el diámetro de la partícula de volumen medio es de 150 μm o menos. Normalmente, en realizaciones en donde el procedimiento de fraccionamiento se realiza a un caudal lineal aplicado superior a 500 cm/min, el diámetro de la partícula de volumen medio es inferior a 120 μm , preferiblemente inferior a 90 μm . Típicamente, en realizaciones donde el procedimiento de fraccionamiento se realiza a un caudal lineal aplicado superior a 600 cm/hora, el diámetro de la partícula de volumen medio es preferiblemente inferior a 85 μm , más preferiblemente inferior a 75 μm .

Fundamentalmente, la expresión de distribución del tamaño de partícula en este contexto es volumen basado en la comprensión general en el campo de la técnica y descrito por Malvern Instruments Ltd (Worcestershire, Reino Unido) en su Guía de Usuarios (MAN 0320 Edición 1.0, Marzo 2004) del Mastersizer 2000E, que describe la medición de la distribución del tamaño de partícula con la ayuda de la dispersión de la luz.

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

Todavía en una realización de la presente invención, la densidad del adsorbente, el diámetro de partícula y el diámetro de la partícula de volumen medio como se ha descrito anteriormente se pueden combinar de cualquier manera posible para proporcionar el adsorbente más adecuado para el aislamiento de una o más proteínas de interés. En una realización de la presente invención, la densidad del adsorbente puede estar en el intervalo de 1,5 a 10,0, el 85% en volumen de las partículas individuales del adsorbente pueden tener un diámetro dentro del intervalo de 10 a 150 micrómetros y el diámetro de la partícula de volumen medio puede estar en el intervalo de 15 a 100 micrómetros. En otra realización de la presente invención, la densidad del adsorbente puede estar en el intervalo de 2,0 a 5,0, el 85% en volumen de las partículas individuales del adsorbente puede tener un diámetro dentro del intervalo de 20 a 140 micrómetros y el diámetro de la partícula de volumen medio puede estar en el intervalo de 55 a 85 micrómetros. En aún una realización de la presente invención, la densidad del adsorbente puede estar en el intervalo de 2,5 a 3,5, el 85% en volumen de las partículas individuales del adsorbente puede tener un diámetro dentro del intervalo de 40 a 120 micrómetros, y el diámetro de la partícula de volumen medio puede estar en el intervalo de 60 a 80 micrómetros.

En una combinación de realizaciones preferidas, en donde el diámetro de la partícula de volumen medio puede ser de 120 μm o menos, la densidad de las partículas es de al menos 1,6 g/ml, más preferiblemente de al menos 1,9 g/ml. Cuando el diámetro de la partícula de volumen medio es inferior a 90 μm , la densidad debe ser al menos 1,8 g/ml o más preferiblemente al menos 2,0 g/ml. Cuando el diámetro de la partícula de volumen medio es inferior a 75 μm , la densidad debe ser al menos 2,0 g/ml, más preferiblemente al menos 2,3 g/ml y lo más preferiblemente al menos 2,5 g/ml.

En una realización de la presente invención, la partícula adsorbente comprende una partícula que tiene un diámetro de la partícula de volumen medio de a lo sumo 150 μm y una densidad de las partículas de al menos 1,5 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 1,6 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 1,9 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 2,0 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 2,3 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 2,5 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 2,8; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 3,0 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 3,5 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 4,0 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 4,5 g/ml. Preferiblemente, la partícula adsorbente comprende una partícula que tiene un diámetro de la partícula de volumen medio de a lo sumo 120 μm y una densidad de las partículas de al menos 1,5 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 1,6 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 1,9 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 2,0 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 2,3 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 2,5 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 2,8; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 3,0 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 3,5 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 4,0 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 4,5 g/ml. Más preferiblemente, la partícula adsorbente comprende una partícula que tiene un diámetro de la partícula de volumen medio de a lo sumo 100 μm y una densidad de las partículas de al menos 1,5 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 1,6 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 1,9 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 2,0 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 2,3 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 2,5 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 2,8; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 3,0 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 3,5 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 4,0 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 4,5 g/ml. Incluso más preferiblemente, la partícula adsorbente comprende una partícula que tiene un diámetro de la partícula de volumen medio de a lo sumo 90 μm y una densidad de las partículas de al menos 1,5 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 1,6 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 1,9 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 2,0 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 2,3 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 2,5 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 2,8; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 3,0 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 3,5 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 4,0 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 4,5 g/ml. Incluso más preferiblemente, la partícula adsorbente comprende una partícula que tiene un diámetro de la partícula de volumen medio de a lo sumo 75 μm y una densidad de las partículas de al menos 1,5 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 1,6 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 1,9 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 2,0 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 2,3 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 2,5 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 2,8; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 3,0 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 3,5 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 4,0 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 4,5 g/ml. Incluso más preferiblemente, la partícula adsorbente comprende una partícula que tiene un diámetro de la partícula de volumen medio de a lo sumo 50 μm y una densidad de las partículas de al menos 1,5 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 1,6 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 1,9 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 2,0 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 2,3 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 2,5 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 2,8; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 3,0 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 3,5 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 4,0 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 4,5 g/ml. Incluso más preferiblemente, la partícula adsorbente comprende una partícula que tiene un diámetro de la partícula de volumen medio de a lo sumo 40 μm y una densidad de las partículas de al menos 1,5 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 1,6 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 1,9 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 2,0 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 2,3 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 2,5 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 2,8; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 3,0 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 3,5 g/ml; p. ej., una densidad de las partículas de al menos 4,0 g/ml; tal como una densidad de las partículas de al menos 4,5 g/ml.

La partícula adsorbente utilizada según la invención debe ser al menos parcialmente permeable a la sustancia biomolecular que se va a aislar para asegurar una capacidad de unión significativa en contraste con las partículas impermeables que sólo pueden unirse a la molécula diana en su superficie dando como resultado una capacidad de unión relativamente baja. La partícula adsorbente puede ser de una matriz de diferentes estructuras, composiciones y formas.

La alta densidad de la partícula adsorbente se consigue, en gran medida, por inclusión en una fase polimérica porosa, de una cierta proporción de un material del núcleo denso no poroso. El núcleo no poroso tiene,

- preferiblemente, una densidad de al menos 4,0 g/ml, tal como al menos 5,0 g/ml, p. ej., al menos 8,0 g/ml, tal como al menos 10 g/ml, p. ej., al menos 15 g/ml. Típicamente, el material del núcleo no poroso tiene una densidad en el intervalo de aproximadamente 4,0-25 g/ml, tal como aproximadamente 4,0-20 g/ml, p. ej., aproximadamente 4,0-15 g/ml, tal como 12-19 g/ml, p. ej., 14-18 g/ml, tal como aproximadamente 6,0-15,0 g/ml, p. ej., aproximadamente 6,0-10 g/ml.
- Otros tipos de partículas adsorbentes de alta densidad se basan en partículas constituidas por un material poroso de alta densidad, tal como óxido de circonio, en el que los ligandos de poros para la adsorción pueden inmovilizarse directamente en el material de alta densidad o en redes poliméricas porosas introducidas en los poros del material de alta densidad, véanse, por ejemplo, los documentos US 6.036.861 y WO 99/51316. Aunque siendo una forma interesante de proporcionar una alta densidad y pequeña partícula adsorbente, tales tipos de adsorbentes tendrán generalmente algunos inconvenientes debido a la restricción de la difusión en la estructura porosa y un alto contenido en volumen de la fase de alta densidad dando como resultado bajos volúmenes accesibles de unión a la proteína.
- Es de trascendental importancia para una amplia gama de realizaciones preferidas de la invención que la partícula adsorbente empleada según la invención tenga un elevado volumen accesible de unión a la proteína. En el presente contexto, la expresión "volumen accesible, de unión a la proteína, de la partícula" se refiere al volumen relativo de poros de cualquier tipo específico de partícula y se expresa como tanto por ciento en volumen con respecto al volumen total del gránulo (es decir, (volumen ocupado por los poros/volumen total del gránulo) x 100%). Por ello, si el material de alta densidad ocupa demasiado volumen de la partícula, sólo se pueden conseguir bajas productividades en la columna.
- En una realización de la presente invención, el volumen accesible, de unión a la proteína, de la partícula adsorbente puede ser al menos 20%, más preferiblemente al menos 30%, todavía más preferiblemente al menos 40%, todavía más preferiblemente al menos 50%, todavía más preferiblemente al menos 55%, todavía más preferiblemente al menos 60%, todavía más preferiblemente al menos 65%, todavía más preferiblemente al menos 70%, todavía más preferiblemente al menos 75%, todavía más preferiblemente al menos 80%, todavía más preferiblemente al menos 85% y todavía más preferiblemente al menos 90%.
- En una realización de la presente invención, el adsorbente puede tener una capacidad de unión dinámica al 10% de saturación para dicha al menos una proteína específica de al menos 5 g por litro de adsorbente sedimentado, más preferiblemente al menos 10 g por litro, incluso más preferiblemente al menos 15 g por litro, todavía más preferiblemente al menos 20 g por litro, todavía más preferiblemente al menos 25 g por litro, todavía más preferiblemente al menos 30 g por litro, todavía más preferiblemente al menos 35 g por litro, todavía más preferiblemente al menos 40 g por litro, todavía más preferiblemente al menos 50 g/litro, todavía más preferiblemente al menos 60 g/litro.
- Cuando se añade la solución proteínica a la columna de adsorbente, la proporción entre la partícula adsorbente presente en la columna y la solución proteínica puede optimizarse para retener una alta capacidad del adsorbente y obtener una alta pureza de la proteína o proteínas a aislar. En una realización preferida de la presente invención, el adsorbente presente en la columna relativo a la solución proteínica que se cargará en la columna se proporciona en una proporción de al menos 1:100, tal como al menos 1:50, p. ej., al menos 1:30, tal como al menos 1:15, p. ej., 1:10, tal como 1:5, tal como 1:1, tal como 1:0,5, medido sobre una base de volumen/volumen.
- Por ello, las partículas adsorbentes pueden estar constituidas por una serie de materiales porosos químicamente derivados que tienen la densidad, diámetro y/o capacidad de unión necesarios para funcionar a los caudales dados per se. Las partículas son de cualquier tipo de conglomerado, como se describe en el documento WO 92/00799, con al menos dos núcleos no porosos rodeados por un material poroso, o del tipo pelicular con un único núcleo no poroso rodeado por un material poroso.
- En el presente contexto, la expresión "tipo de conglomerado" se refiere a una partícula de un material en partículas, que comprende gránulos de material del núcleo de diferentes tipos y tamaños, mantenidos unidos por la matriz de base polimérica, p. ej., una partícula de núcleo que consiste en dos o más partículas de alta densidad mantenidas juntas por una matriz de base polimérica circundante (por ejemplo, agarosa).
- En el presente contexto, la expresión "tipo pelicular" se refiere a un material compuesto de partículas, en donde cada partícula consiste en sólo un material del núcleo de alta densidad revestido con una capa de matriz de base polimérica porosa, p. ej., un gránulo de acero inoxidable de alta densidad revestido con agarosa.
- Por consiguiente, la expresión "al menos un núcleo no poroso de alta densidad" se refiere a cualquier núcleo pelicular, que comprende una única partícula no porosa de alta densidad o se refiere a un núcleo de conglomerado que comprende más de una partícula no porosa de alta densidad.
- La partícula adsorbente, como se ha indicado, puede comprender un núcleo no poroso de alta densidad con un material poroso que rodea al núcleo y dicho material poroso comprende, opcionalmente, un ligando en su superficie exterior.

En el presente contexto, el término "núcleo" se refiere a la partícula de núcleo o partículas de núcleo no poroso que están presentes dentro de la partícula adsorbente. La partícula de núcleo o las partículas de núcleo pueden estar circunstancialmente distribuidas dentro del material poroso y no están limitadas a estar localizadas en el centro de la partícula adsorbente.

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

10 Ejemplos de materiales del núcleo no poroso adecuados son compuestos inorgánicos, metales, metales pesados, elementos no metálicos, óxidos metálicos, óxidos de no metales, sales metálicas y aleaciones metálicas, etc., siempre que se cumplan los criterios de densidad anteriores. Ejemplos de tales materiales del núcleo son silicatos metálicos, borosilicatos metálicos; materiales cerámicos que incluyen diboruro de titanio, carburo de titanio, diboruro de circonio, carburo de circonio, carburo de wolframio, carburo de silicio, nitruro de aluminio, nitruro de silicio, nitruro de titanio, óxido de itrio, polvo de silicio metálico y disiliciuro de molibdeno; óxidos y sulfuros de metales, que incluyen óxido de magnesio, aluminio, titanio, vanadio, cromo, circonio, hafnio, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre y plata; óxidos de no metales; sales metálicas, que incluyen sulfato de bario; elementos metálicos, que incluyen wolframio, circonio, titanio, hafnio, vanadio, cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, indio, cobre, plata, oro, paladio, platino, rutenio, osmio, rodio e iridio, y aleaciones de elementos metálicos, tal como las aleaciones formadas entre dichos elementos metálicos, p. ej., acero inoxidable; formas cristalina y amorfa de carbono, que incluyen grafito, negro de carbón y carbón vegetal. Los materiales del núcleo no poroso preferidos son gránulos de carburo de wolframio, wolframio, acero y titanio tales como los gránulos de acero inoxidable.

El material poroso es una matriz de base polimérica utilizada como un medio para cubrir y mantener unidos múltiples (o uno solo) núcleos y dentro de la partícula adsorbente y como un medio para unir el ligando adsorbente.

25 La matriz de base polimérica se puede buscar entre ciertos tipos de polímeros orgánicos naturales o sintéticos, típicamente seleccionados de i) polisacáridos naturales y sintéticos y otros polímeros basados en carbohidratos, que incluyen agar, alginato, carragenano, goma guar, goma arábica, goma ghatti, goma tragacanto, goma karaya, goma de algarrobo, goma de xantano, agarosas, celulosas, pectinas, mucinas, dextranos, almidones, heparinas, quitosanos, hidroxialmidones, hidroxipropilalmidones, carboximetilalmidones, hidroxietilcelulosas, hidroxipropilcelulosas y carboximetilcelulosas; ii) polímeros y monómeros orgánicos sintéticos que dan como resultado polímeros, que incluyen polímeros acrílicos, poliamidas, poliimidias, poliésteres, poliéteres, compuestos vinílicos poliméricos, polialquenos, y derivados sustituidos de los mismos, así como copolímeros que comprenden más de una funcionalidad del polímero, y derivados sustituidos de los mismos; y iii) mezclas de los mismos.

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

35 Los investigadores de la presente invención han encontrado que con el fin de asegurar una adsorción eficaz a caudales elevados es necesario minimizar el diámetro de la partícula de volumen medio de la partícula adsorbente. Por ello, en una realización preferida de la presente invención, la partícula adsorbente tiene un diámetro de la partícula de volumen medio a lo sumo de 150 μm , típicamente un diámetro de la partícula de volumen medio en el intervalo de aproximadamente 40 μm a 150 μm . La partícula adsorbente tiene normalmente un diámetro de la partícula de volumen medio a lo sumo de 120 μm , particularmente a lo sumo de 100 μm , más preferiblemente a lo sumo de 90 μm , de 80 μm o de 75 μm , más preferiblemente de 70 μm y lo más preferiblemente a lo sumo de 60 μm .

45 Desde el punto de vista de la productividad, es importante que el adsorbente pueda unirse a una gran cantidad de la sustancia biomolecular por unidad de volumen del adsorbente. Por ello, los autores de la invención han encontrado que es preferible aplicar adsorbentes que tengan una fase polimérica (es decir, la red polimérica permeable donde está situado un ligando y en donde tiene lugar la adsorción real) que constituya al menos el 50% del volumen de la partícula adsorbente, preferiblemente al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 80% y lo más preferiblemente al menos el 90% del volumen de las partículas adsorbentes.

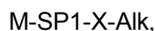
El ligando

50 El procedimiento de aislamiento de una o más proteínas puede proporcionarse y facilitarse uniendo un ligando adecuado al adsorbente. En una realización de la presente invención, el adsorbente comprende un polímero matriz funcionalizado que lleva una pluralidad de ligandos que comprenden grupos funcionales unidos de forma covalente. En una realización preferida de la presente invención, el ligando comprende un sistema de anillo aromático o heteroaromático y uno o más grupos ácidos.

55 En el presente contexto, la expresión "polímero matriz funcionalizado" se refiere al sitio de anclaje del ligando que fomenta las características deseadas de adsorción a la proteína. Dependiendo de la estructura de la partícula adsorbente, el polímero matriz puede formar la cadena principal o esqueleto que define la forma física de las partículas adsorbentes o puede ser un polímero que esté ocupando los poros de otro material que sirva como cadena principal o esqueleto de las partículas. En realizaciones preferidas, el polímero matriz funcionalizado es un

polímero orgánico sintético o natural, tal como un polisacárido (p. ej., polímeros poliacrílicos, agarosa o celulosa), o puede ser un polímero inorgánico, tal como sílice. En casos especiales, el propio polímero matriz puede constituir el sitio de adsorción de la proteína, en cuyo caso no es necesario inmovilizar otros ligandos sobre el polímero.

5 En una realización de la presente invención, el adsorbente comprende un polímero matriz funcionalizado que lleva una pluralidad de grupos funcionales unidos de forma covalente, teniendo dichos grupos la fórmula general:



10 en donde que M designa el polímero adsorbente; SP1 designa un espaciador opcional opcionalmente sustituido con -A-SP2-ACID, -A, o -ACID; X designa -O-, -S-, -H-, o -NAlk-; Alk puede estar ausente o ser -A-SP2-ACID, -A, -ACID o alquilo C₁₋₄, donde alquilo C₁₋₄ puede estar opcionalmente sustituido con -A-SP2-ACID, -A o -ACID; A designa un resto aromático o heteroaromático opcionalmente sustituido; SP2 designa un espaciador opcional; y ACID designa uno o más grupos ácidos; en donde al menos uno de SP1 o Alk está sustituido con -A-SP2-ACID o -A, y al menos uno de SP1 o Alk comprende -ACID y en donde al menos uno de SP1 o Alk está presente. Si Alk está ausente, X también estará ausente.

15 En una realización de la presente invención, el adsorbente puede acoplarse con un ligando que lleva una carga positiva a un valor de pH de pH 10 o inferior, tal como pH 9 o inferior, p. ej., pH 8 o inferior, tal como pH 7 o inferior, p. ej., pH 6 o inferior, tal como pH 5 o inferior, p. ej., pH 4 o inferior.

20 Además se ha encontrado que los grupos funcionales no deben ser demasiado grandes en tamaño y complejidad con el fin de obtener una alta capacidad de unión y una alta estabilidad química del adsorbente. Por ello, se ha encontrado que un tamaño mayor en lo que respecta a peso molecular y número de sistemas de anillo presentes en el grupo funcional en muchos casos sólo aumentan el coste del adsorbente sin dar el beneficio de una mayor capacidad de unión en lo que respecta a la cantidad de proteína que puede unirse por litro de adsorbente. También, la concentración molar del grupo funcional unido de forma covalente realizable en el adsorbente puede ser menor si se emplea un tamaño molecular grande del grupo funcional (presumiblemente debido a impedimento estérico).

25 Por ello, en una realización de la invención, los grupos funcionales unidos de forma covalente comprenden un máximo de tres sistemas de anillo mono- o bicíclicos, aromáticos o heteroaromáticos, para cada grupo funcional unido al polímero matriz, más preferiblemente un máximo de dos sistemas de anillo monocíclicos o bicíclicos, aromáticos o heteroaromáticos, e incluso más preferiblemente un máximo de un sistema de anillo mono- o bicíclicos, aromáticos o heteroaromáticos, para cada grupo funcional unido al polímero matriz. De manera similar, en una realización de la invención, los grupos funcionales unidos de forma covalente comprenden un máximo de tres grupos ácidos, preferiblemente un máximo de 2 grupos ácidos y lo más preferiblemente un máximo de un grupo ácido unido a cada sistema de anillo aromático o heteroaromático presente en los grupos funcionales unidos de forma covalente.

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

35 En una realización de la presente invención, el ligando puede derivarse de un grupo dietilaminoetilo, una polialquiliminina, una alquil-amina, una alquil-diamina o una polialililamina. Preferiblemente, pueden ser adecuadas alquil-amina o alquil-diamina que tienen una longitud de cadena de 3-14 átomos y 1-5 grupos funcionales amino. Los átomos que forman parte de la cadena pueden involucrar C (carbono), N (nitrógeno), O (oxígeno) y/o S (azufre).

40 Aún en una realización de la presente invención, el adsorbente puede comprender un ligando, que tiene tanto grupos aromáticos como grupos amino tales como una amina aromática o una diamina aromática. Preferiblemente, la diamina aromática es 1,4-xilen-diamina o isómeros de 1,4-xilendiamina.

45 Aún en una realización de la presente invención, el adsorbente puede acoplarse con un ligando que tiene un grupo ácido, un resto aromático o heteroaromático, un grupo heteroaromático bicíclico sustituido o cualquier combinación de los mismos, tal como un ligando que tiene un grupo ácido y un resto aromático o heteroaromático, un ligando que tiene un grupo ácido y un grupo heteroaromático bicíclico sustituido o un resto aromático o heteroaromático y un grupo heteroaromático bicíclico sustituido.

En otra realización de la presente invención, el ligando comprende un grupo heteroaromático bicíclico sustituido que puede derivarse de compuestos seleccionados del grupo que consiste en bencimidazoles, benzotiazoles y benzoxazoles.

50 En una realización de la presente invención, el ligando puede ser un ácido aromático o heteroaromático seleccionado del grupo que consiste en ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, ácidos fosfónicos y ácidos borónicos. Preferiblemente, el ligando puede seleccionarse del grupo que consiste en ácido 2-mercaptobenzoico, ácido 2-mercaptonicotínico, ácido 2-aminobenzoico, ácido 3-aminobenzoico y ácido 4-aminobenzoico, ácido 4-hidroxifenil-mercapto-acético, ácido 4-hidroxifenil-mercapto-propanoico, ácido 4-hidroxifenil-mercapto-butanoico, ácido 2,3-dihidroxi-benzoico, ácido 2,4-dihidroxi-benzoico, ácido 2,5-dihidroxi-benzoico, ácido 2,6-dihidroxi-benzoico, ácido 3,4-dihidroxi-benzoico, ácido 3,5-dihidroxi-benzoico, ácido mercapto-bencimidazol-sulfónico, ácido ortanílico, ácido metanílico, ácido sulfanílico, ácido 4-metilaniлина-2-sulfónico, ácido 4-metoxianilina-2-sulfónico, ácido anilina-2,5-

disulfónico, ácido N-metilmetanílico, ácido 7-amino-1-naftol-3-sulfónico, ácido 1-naftol-4-sulfónico, ácido 2-naftol-6-sulfónico y ácido 2-hidroxi-3-naftoico y ácido 2-mercaptobenzimidazol-sulfónico.

En una realización de la presente invención, el ligando puede ser un ácido N-benzoil-amina, o un ácido N-benzoil-amina que comprende grupos tiol o mercapto.

- 5 Aún en una realización de la presente invención el ligando puede acoplarse al adsorbente a través de un enlace tio-éter, un enlace amino, o un enlace oxígeno-éter.

10 La concentración óptima de los grupos funcionales unidos de forma covalente (los ligandos) en la cadena principal del adsorbente polimérico (también referido frecuentemente como la densidad de grupos funcionales o la concentración de ligando) dependerá de la estructura detallada del grupo funcional y del tipo de material adsorbente utilizado para preparar el adsorbente.

15 Con el fin de asegurar una óptimas resistencia de adsorción y la productividad del adsorbente, se ha encontrado que puede ser importante la concentración de ligando en el adsorbente. Por ello, en una realización adecuada, el adsorbente lleva ligandos para la adsorción de las sustancias biomoleculares en una concentración de al menos 20 mM, tal como al menos 30 mM o al menos 40 mM, preferiblemente al menos 50 mM y lo más preferiblemente al menos 60 mM .

20 Sin embargo, generalmente sería preferible que el adsorbente tuviera una concentración de grupos funcionales unidos de forma covalente en el intervalo de 5-500 milimoles por litro de adsorbente en su estado de lecho sedimentado (empaquetado), más preferiblemente en el intervalo de 10-250 milimoles por litro, todavía más preferiblemente en el intervalo de 10-125 milimoles por litro, todavía más preferiblemente en el intervalo de 15 a 100 milimoles por litro, todavía más preferiblemente en el intervalo de 20-80 milimoles por litro, todavía más preferiblemente en el intervalo de 25-75 milimoles por litro, todavía más preferiblemente en el intervalo de 30-60 milimoles por litro.

25 En una realización de la presente invención, los grupos funcionales unidos de forma covalente pueden estar unidos al adsorbente por cualquier tipo de enlace covalente conocido per se para ser aplicable con este fin, ya sea por una reacción química directa entre el ligando y el adsorbente o por una activación precedente del adsorbente o del ligando con un reactivo adecuado conocido per se que permite enlazar la cadena principal de la matriz polimérica y el grupo funcional. Ejemplos de tales reactivos de activación adecuados son epiclorhidrina, epibromhidrina, alilglicidil-éter; bis-epóxidos tal como butanodioldiglicidiléter; compuestos alifáticos sustituidos con halógeno tales como di-cloro-propanol, carbonildiimidazol; aldehídos tal como dialdehído glutárico; quinonas; peryodatos tales como meta-peryodato de sodio; carbodiimidias; cloruros de sulfonilo tales como cloruros de tosilo y cloruros de tresilo; N-hidroxi-succinimidias; tolueno-4-sulfonatos de 2-fluoro-1-metilpiridinio; oxazolonas; maleimidias; disulfuros de piridilo; e hidrazidas. Entre estos, se prefieren los reactivos de activación que dejan un grupo espaciador SP1 diferente de un enlace sencillo, p. ej., epiclorhidrina, epibromhidrina, alil-glicidiléter; bis-epóxidos; compuestos alifáticos sustituidos con halógeno; aldehídos; quinonas; bromuro de cianógeno; cloro-triazinas; oxazolonas; maleimidias; disulfuros de piridilo; e hidrazidas.

35 Reactivos de activación especialmente interesantes son los compuestos epoxídicos tales como epiclorhidrina, alil-glicidiléter y butanodioldiglicidiléter y poliglicidiléteres tal como glicerol poliglicidiléter. En ciertos casos en los que se puede demostrar que la estabilidad de la unión covalente del grupo funcional es estable al tratamiento con hidróxido de sodio, p. ej., hidróxido de sodio 0,1 M a 2 M, el reactivo de activación puede basarse en reactivos derivados de triazina, p. ej., cloro-triazinas tal como cloruro cianúrico.

40 Las posibilidades anteriormente mencionadas hacen importante definir la presencia de un espaciador opcional SP1 que reviste la cadena principal del adsorbente polimérico (también denominado polímero matriz) y el grupo funcional. En el presente contexto, el espaciador SP1 puede considerarse que es parte del reactivo de activación, que forma el enlace entre el polímero matriz y el grupo funcional. Por ello, el separador SP1 corresponde a los reactivos de activación y las reacciones de acoplamiento implicadas. En algunos casos, p. ej., cuando se utilizan carbodiimidias, el reactivo de activación forma una forma activada del polímero matriz o del reactivo del grupo funcional. Después del acoplamiento no se deja ninguna parte del reactivo de activación entre el grupo funcional y el polímero matriz, y por ello el SP1 es simplemente un enlace sencillo.

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

50 Todavía en otros casos, el espaciador SP1 puede comprender un anillo aromático o heteroaromático, que desempeñe una función significativa de las características de unión del adsorbente. Este sería, por ejemplo, el caso si se usaran quinonas o clorotriazinas como agentes de activación del adsorbente o del grupo funcional.

55 En un caso adicional, el espaciador SP1 puede ser un enlace sencillo o un biradical derivado de un reactivo de

activación seleccionado de epíclorhidrina, alil-glicidiléter, bromuro de alilo, bis-epóxidos tal como butanodioldiglicidiléter, compuestos alifáticos sustituidos con halógeno tal como 1,3-dicloropropano-2-ol, aldehídos tales como dialdehído glutárico, quinonas, bromuro de cianógeno, cloro-triazinas tal como cloruro cianúrico, tolueno-4-sulfonatos de 2-fluoro-1-metilpiridinio, maleimidias, oxa-zolonas e hidrazidas.

- 5 En una realización de la presente invención, el espaciador SP1 puede ser un biradical alifático de cadena corta, p. ej., que tiene la fórmula $-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH}_2-$ (derivado de epíclorhidrina), $-(\text{CH}_2)_3\text{-O-CH}_2\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH}_2-$ (derivado de alil-glicidiléter) o $-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH}_2\text{-O-}(\text{CH}_2)_4\text{-O-CH}_2\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH}_2-$ (derivado de butano-dioldiglicidiléter); o un enlace simple.

10 En una realización de la presente invención, los adsorbentes comprenden típicamente un ligando que comprende grupos aromáticos o heteroaromáticos (radicales) seleccionados entre los grupos que comprenden i) ligandos que comprenden los siguientes tipos como grupos funcionales: ácidos benzoicos tales como ácidos 2-aminobenzoicos, ácidos 3-aminobenzoicos, ácidos 4-aminobenzoicos, ácidos 2-mercapto-benzoicos, ácido 4-amino-2-clorobenzoico, ácido 2-amino-5-clorobenzoico, ácido 2-amino-4-clorobenzoico, ácidos 4-aminosalicílicos, ácidos 5-aminosalicílicos, ácidos 3,4-diaminobenzoico, ácido 3,5-diaminobenzoico, ácido 5-aminoisoftálico, ácido 4-aminoftálico; ácidos
15 cinámicos tal como ácidos hidroxí-cinámicos; ácidos nicotínicos tal como ácidos 2-mercaptónicotínicos; ácidos naftoicos tal como ácido 2-hidroxi-1-naftoico; quinolinas tal como 2-mercaptoquinolina; ácidos tetrazolacéticos tal como ácido 5-mercapto-1-tetrazolacético; tiadiazoles tal como 2-mercapto-5-metil-1,3,4-tiadiazol; bencimidazoles tales como 2-amino-bencimidazol, 2-mercaptobencimidazol y 2-mercapto-5-nitrobencimidazol; benzotiazoles tales como 2-aminobenzotiazol, 2-amino-6-nitrobenzotiazol, 2-mercaptobenzotiazol y 2-mercapto-6-etoxibenzotiazol;
20 benzoxazoles tal como 2-mercaptobenzoxazol; tiofenoles tales como tiofenol y 2-aminotiofenol; ácido 2-(4-aminofenil)acético; ácidos sulfónicos aromáticos o heteroaromáticos y ácidos fosfónicos, tales como ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico y fenoles tales como 2-amino-4-nitro-fenol. Debe señalarse que el caso donde M es agarosa, SP1 es un derivado de vinilsulfona y L es ácido 4-aminobenzoico puede ser específicamente no reivindicado en relación con las matrices en fase sólida según la invención, consúltese el documento WO 92/16292,
25 lo más preferiblemente ácidos aminobenzoicos como ácido 2-amino-benzoico, ácido 2-mercapto-benzoico, ácido 3-aminobenzoico, ácido 4-aminobenzoico, ácido 4-amino-2-clorobenzoico, ácido 2-amino-5-clorobenzoico, ácido 2-amino-4-clorobenzoico, ácidos 4-aminosalicílico, ácidos 5-aminosalicílico, ácidos 3,4-diaminobenzoico, ácido 3,5-diaminobenzoico, ácido 5-aminoisoftálico, ácido 4-aminoftálico. En general, el acoplamiento que utiliza divinilsulfona puede no ser adecuado debido a que el acoplamiento de divinilsulfona es inestable cuando se pone en
30 contacto con un alcalino y como los alcalinos son actualmente los agentes de limpieza más adecuados y usados, los adsorbentes acoplados con divinilsulfona no se consideran importantes industrialmente; ii) ligandos que comprenden ácidos 2-hidroxi-cinámicos, ácido 3-hidroxi-cinámico y ácido 4-hidroxi-cinámico; iii) ligandos que comprenden un ácido carboxílico y un grupo amino como sustituyentes tales como ácido 2-amino-nicotínico, ácido 2-mercapto-nicotínico, ácido 6-amino-nicotínico y ácido 2-amino-4-hidroxipirimidin-carboxílico; iv) ligando que comprende
35 radicales derivados de un anillo de benceno condensado con un sistema de anillo heteroaromático, p. ej., un ligando seleccionado de bencimidazoles tales como 2-mercapto-bencimidazol y 2-mercapto-5-nitro-bencimidazol; benzotiazoles tales como 2-amino-6-nitrobenzotiazol, 2-mercaptobenzotiazol y 2-mercapto-6-etoxibenzotiazol; benzoxazoles tales como 2-mercaptobenzoxazol; y v) ligandos elegidos del grupo de tiofenoles tales como tiofenol y 2-aminotiofenol.

- 40 Dentro de la realización en la que el ligando se selecciona de entre los grupos i)-v) anteriormente mencionados, los adsorbentes tienen típicamente una capacidad de unión dinámica de al menos 10 g de sustancia biomolecular por litro, más preferiblemente al menos 20 g por litro, todavía más preferible al menos 30 g por litro cuando se ensayan según las condiciones del procedimiento utilizadas en la aplicación correspondiente. La capacidad de unión del adsorbente puede determinarse en términos de su capacidad de unión a la albúmina de suero bovino (BSA). La
45 capacidad de unión es típicamente tal que al menos 10 g/l de BSA se unen según el Procedimiento A de ensayo.

Procedimiento A

El procedimiento A es un procedimiento utilizado para determinar la capacidad de unión a albúmina bovina de adsorbentes seleccionados que consiste en el siguiente procedimiento:

- 50 *Solución de albúmina de suero bovino pH 4,0 (BSA, pH 4,0):* Se disuelve albúmina de suero bovino purificada (A 7906, Sigma, EE.UU.) hasta una concentración final de 2 mg/ml en citrato de sodio 20 mM pH 4,0. Los adsorbentes se lavan con 50 volúmenes de citrato de sodio 20 mM pH 4,0 y se drenan en un filtro de succión.

Se coloca una muestra de 1,0 ml de adsorbente drenado por succión en un tubo de ensayo de 50 ml seguido de la adición de 30 ml de BSA, pH 4,0.

- 55 El tubo de ensayo se cierra después con un tapón y la suspensión se incuba en un mezclador de rodillos durante 2 horas a temperatura ambiente (20-25 °C). El tubo de ensayo se centrifuga después durante 5 min a 2.000 rpm para sedimentar completamente el adsorbente. El sobrenadante se aísla después desde el adsorbente pipeteando en un tubo de ensayo independiente, evitando el transporte de cualquier partícula adsorbente y se filtra a través de un pequeño filtro de 0,2 mm no adsorbente (Millipore, EE.UU.). Después de esto, se realiza una determinación de la concentración de BSA no unida en el sobrenadante midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm en un

espectrofotómetro.

La cantidad de BSA unida al adsorbente se calcula después según la siguiente fórmula:

mg de BSA unidos por ml de adsorbente drenado por succión = $(1 - (\text{DO del sobrenadante del ensayo}/\text{DO de la solución de partida de BSA})) \times 60 \text{ mg de BSA/ml de adsorbente.}$

5 Los parámetros del procedimiento

Como se ha mencionado anteriormente, la solución proteínica que comprende una o más proteínas de interés se ajusta para que tenga un pH preestablecido y una fuerza iónica preestablecida.

10 En el presente contexto, el término "preestablecido" se refiere al ajuste del pH o de la fuerza iónica, respectivamente, a un valor específico y predeterminado con el fin de seleccionar la capacidad del adsorbente para unir una o más de las proteínas de interés y aumentar de ese modo la eficacia del adsorbente para el aislamiento de la proteína o de las proteínas.

15 En una realización de la presente invención, el pH preestablecido está en el intervalo de pH 3,0 a pH 10,0, preferiblemente en el intervalo de pH 4 a pH 9, más preferiblemente en el intervalo de pH 4 a pH 8, incluso más preferiblemente en el intervalo de pH 4 a pH 7, todavía más preferiblemente en el intervalo de pH 4 a pH 6, todavía más preferiblemente en el intervalo de pH 4,5 a pH 5,5 o en el intervalo de pH 4 a pH 10, preferiblemente en el intervalo de pH 5 a pH 9, más preferiblemente en el intervalo de pH 6 a pH 9, incluso más preferiblemente en el intervalo de pH 6 a pH 8.

20 En aún una realización de la presente invención, la fuerza iónica preestablecida está en el intervalo de 0,0001 a 12,0, preferiblemente en el intervalo de 0,0001 a 5, más preferiblemente en el intervalo de 0,0001 a 1, incluso más preferiblemente en el intervalo de 0,0001 a 0,1, todavía más preferiblemente en el intervalo de 0,0001 a 0,075, todavía más preferiblemente en el intervalo de 0,01 a 0,05 o en el intervalo de 0,1 a 12,0, preferiblemente en el intervalo de 0,5 a 12, más preferiblemente en el intervalo de 1 a 12, incluso más preferiblemente en el intervalo de 1,5 a 12, todavía más preferiblemente en el intervalo de 2 a 12, todavía más preferiblemente en el intervalo de 4 a 12.

25 Para obtener una o más proteínas del adsorbente, se eluyen una o más de las proteínas con uno o más tampones. En la presente invención, el adsorbente se lava con un tampón de lavado para retirar por lavado el material no unido antes de eluir una o más proteínas del adsorbente.

Eliminación de los virus

30 Para aumentar las medidas de seguridad necesarias para impedir la propagación de enfermedades víricas desde los donantes de sangre hasta los receptores de los productos sanguíneos, puede ser necesario introducir una o más etapas para la eliminación de los virus.

En una realización de la presente invención, la solución proteínica puede someterse al menos a un tratamiento de eliminación de los virus. Preferiblemente, se puede realizar al menos un tratamiento de eliminación de los virus antes de poner en contacto la solución proteínica con el adsorbente.

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

En una realización de la presente invención pueden realizarse varias etapas de eliminación de los virus y preferiblemente se puede realizar un tratamiento de eliminación de los virus antes de ponerse en contacto la solución proteínica con el adsorbente.

40 En una realización de la presente invención pueden realizarse varias etapas de eliminación de virus y preferiblemente se realiza un tratamiento de eliminación de los virus antes de poner en contacto la solución proteínica con el adsorbente y, durante la etapa de adsorción, cualquiera de las sustancias, tales como detergentes y/o disolventes orgánicos, añadidos a la solución proteínica permanecen no unidos al adsorbente y se retiran por lavado de la columna antes de la elución de la proteína a aislar.

45 Aún en una realización de la presente invención, un procedimiento para eliminar los virus en fluidos biológicos puede realizarse mediante un tratamiento con disolventes orgánicos y/o detergentes; especialmente el tratamiento con fosfato de tri(n-butilo) (TNBP) y detergentes no iónicos como Tween 80 o Triton X-100. Este procedimiento puede dar como resultado una excelente recuperación de proteínas lábiles, p. ej., factores VIII y IX de coagulación, mientras se consigue un alto nivel de muerte vírica, p. ej., la muerte de $>10^6$ a $>10^8$ ID, de virus envueltos; sin embargo, poca eliminación de virus no envueltos. El documento US 4.481.189 describe la eliminación vírica mediante un tratamiento con detergente no aniónico, alcoholes, éteres o mezclas de los mismos. El documento US 4.481.189 se incorpora aquí por referencia.

Otros procedimientos de eliminación de virus comúnmente aplicados, y aplicables en la presente invención, a fluidos

biológicos que se usarán en un tratamiento de transfusión pueden también implicar un tratamiento con calor a temperaturas de 60 °C o más, o el tratamiento con UVC unidos solos o unidos con B-propiolactona (B-PL).

Otras realizaciones

5 En la presente invención, el procedimiento implica la etapa de someter el adsorbente a un tampón de elución (un primer tampón de elución) para eluir al menos una de dichas una o más proteínas.

10 El uso de un adsorbente acoplado con un grupo funcional (ligando) según la presente invención, para el aislamiento de una o más proteínas a partir de una solución proteínica tal como a partir de plasma o suero u otras fuentes derivadas de la sangre pueden comprender las etapas de: (i) Proporcionar una solución proteínica que comprende una o más proteínas de plasma o suero que tienen un pH preestablecido y una fuerza iónica preestablecida, (ii) poner en contacto dicha solución con un adsorbente, opcionalmente lavado con uno o más tampones de equilibrado, en el que una o más proteínas de plasma o suero puede unirse reversiblemente al adsorbente o permanece no unida, (iii) lavar el adsorbente con un tampón de lavado para obtener una fracción proteínica que comprende material no unido, (iv) lavar el adsorbente con al menos un tampón de elución para obtener al menos un eluato que comprende proteína o proteínas que se unen reversiblemente mediante el adsorbente, (v) someter la proteína o proteínas obtenidas en el tampón de elución o la proteína o proteínas obtenidas en el tampón de elución hasta el tratamiento aguas abajo adicional que puede incluir al menos una etapa de eliminación vírica. Además, el ligando acoplado al adsorbente puede comprender un polímero matriz funcionalizado que lleva una pluralidad de grupos funcionales unidos de forma covalente que comprenden un sistema de anillos aromático o heteroaromático y uno o más grupos ácidos que se cargan negativamente por encima de pH 4,0.

20 Con el fin de eliminar el material no unido, incluyendo proteína o proteínas no unidas, el adsorbente se somete a un tampón de lavado. En la presente invención, una o más proteínas a aislar de la solución proteínica pueden retirarse por lavado del adsorbente con el tampón de lavado. Este lavado se realiza antes de someter el adsorbente a un tampón de elución como se ha descrito anteriormente. En una realización de la presente invención, el inhibidor de la proteinasa alfa 1 puede retirarse por lavado con el tampón de lavado como una proteína no unida. Las condiciones del procedimiento, el adsorbente y el ligando podrían ser fácilmente modificados por el experto en la técnica de tal manera que una o más proteínas de suero o plasma humano (distintas del inhibidor de la proteinasa alfa 1) puedan ser retiradas por lavado con el tampón de lavado y el inhibidor de la proteinasa alfa 1 puede estar unido.

25 En una realización, el lavado y/o la elución se pueden realizar con un tampón de lavado y/o un tampón de elución que tiene un pH más alto y/o una mayor fuerza iónica que el pH preestablecido y la fuerza iónica preestablecida de la solución proteínica.

30 Todavía en otra realización, el tampón de lavado y/o el tampón de elución pueden comprender uno o más compuestos que tienen un grupo hidrófobo así como un grupo con carga negativa dentro de la misma molécula, p. ej., detergente con carga negativa tal como sulfato de octilo, azul de bromofenol, sulfonato de octano, laurilsarcosinato de sodio, sulfonato de hexano, dodecilsulfato de sodio y caprilato de sodio.

35 Con el fin de obtener una o más proteínas adicionales del adsorbente, el procedimiento según la presente invención puede comprender además la etapa de elución con uno o más tampones de elución adicionales para eluir la proteína o proteínas que quedan.

40 En el presente contexto, la expresión "tampón o tampones de elución adicionales" se refiere al tampón o tampones utilizados posteriormente para la elución de una o más proteínas, que permanece unida al adsorbente después de la elución con el primer tampón de elución.

En el presente contexto, la expresión "proteína o proteínas que quedan" se refiere a una o más proteínas que permanecen unidas al adsorbente después de ser sometidas a un primer tampón de elución y cuya proteína o proteínas pueden ser posteriormente eluidas por la adición de un tampón de elución adicional.

45 En una realización de la presente invención, el adsorbente puede lavarse con un tampón de lavado adicional entre cada etapa de elución.

50 En el presente contexto, la expresión "fracción proteínica" se refiere a las recolecciones obtenidas del adsorbente en las que pueden estar situadas una o más de las proteínas a aislar. Esta fracción proteínica puede someterse a un tratamiento adicional aguas abajo para el aislamiento adicional de una o más proteínas presentes. El tratamiento adicional aguas abajo puede involucrar operaciones como filtración, centrifugación, sedimentación, microfiltración, precipitación y cromatografía. En una realización de la presente invención, la cromatografía involucra la cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de fase inversa, donde la proteína o proteínas pueden unirse a un segundo adsorbente en un posterior tratamiento aguas abajo.

55 En una realización de la presente invención, el tratamiento aguas abajo adicional puede comprender la adsorción de la proteína en la fracción o fracciones de proteínas, tal como el inhibidor de la proteinasa alfa 1, a un intercambiador de iones con carga positiva.

En una realización de la presente invención, el tratamiento aguas abajo adicional puede comprender la adsorción de la proteína en la fracción o fracciones de proteína, tal como el inhibidor de la proteinasa alfa 1, a una alquil-amina tal como una alquil-diamina tal como diamino-hexano, diamino-heptano, diamino-octano, diamino-nonano, diamino-decano y sus isómeros o derivados.

- 5 En una realización de la presente invención, el inhibidor de la proteinasa alfa 1 no está unido en la primera etapa de adsorción y el tratamiento aguas abajo adicional comprende la adsorción de la proteinasa alfa 1 a una alquilamina tal como una alquil-diamina tal como diamino-hexano, diamino-heptano, diamino-octano, diamino-nonano, diamino-decano o isómeros o derivados de estos.

- 10 En una realización de la presente invención, el tratamiento aguas abajo adicional puede comprender la adsorción de la proteína en la fracción proteínica, tal como el inhibidor de la proteinasa alfa 1, a un adsorbente en presencia de una sal liotrópica tal como, pero sin limitarse a, sulfato de amonio, sulfato de potasio, sulfato de sodio, fosfato de amonio, fosfato de potasio y citrato de sodio. En una realización preferida, la concentración de sal liotrópica en la solución que comprende el inhibidor de la proteinasa alfa 1 es al menos 0,1 M, al menos 0,25 M, tal como al menos 0,5 M, al menos 0,75 M, al menos 1 M, al menos 1,25 M, al menos 1,5 M, al menos 1,75 M o al menos 2 M.

- 15 Aún en una realización de la presente invención, el tratamiento aguas abajo adicional puede comprender la adsorción de la proteína en la fracción proteínica, como el inhibidor de la proteinasa alfa 1, a un adsorbente en presencia o ausencia de una sal liotrópica en donde el adsorbente comprende un ligando hidrófobo tal como un ligando no cargado que comprende cadenas alquílicas largas opcionalmente sustituidas (p. ej., grupos derivados de butilo, hexilo, octilo, decilo y dodecilo) y/o estructuras aromáticas y heteroaromáticas (p. ej., grupos derivados de fenilo, naftilo y bencimidazol). También se prefieren ligandos como los descritos en el documento US 6.610.630, en donde se describen adsorbentes cromatográficos que utilizan ligandos mercapto-heterocíclicos, incorporados en la presente por referencia. Otros ligandos preferidos son ligandos en modo mixto que comprenden una carga positiva a, y por debajo, de aproximadamente pH 4, tales como ligandos con carga positiva que comprenden cadenas alquílicas largas opcionalmente sustituidas (p. ej., grupos derivados de butilo, hexilo, octilo, decilo y dodecilo) y/o estructuras aromáticas y heteroaromáticas (p. ej., grupos derivados de fenilo, naftilo y bencimidazol). Ejemplos no limitantes de tales ligandos son butilamina-, hexilamina-, octilamina-, bencilamina- y fenilbutilamina-.
- 20
- 25

En una realización de la presente invención, 2 o más proteínas de la solución proteínica son aisladas por medio de una cascada de 2 o más adsorbentes, tal como 3 adsorbentes, p. ej., 4 adsorbentes, tal como 5 adsorbentes, p. ej., 6 adsorbentes, tal como 7 adsorbentes, p. ej., 8 adsorbentes, tal como 9 adsorbentes, p. ej., 10 adsorbentes.

- 30 En una cascada de 3 adsorbentes puede ocurrir el siguiente procedimiento:
- a) el primer adsorbente puede capturar una o más proteína o proteínas del plasma;
- b) el segundo adsorbente puede capturar una o más proteína o proteínas del plasma diferentes de las una o más proteína o proteínas del plasma que pueden ser capturadas por el primer adsorbente; y
- 35 c) el tercer adsorbente puede capturar una o más proteína o proteínas del plasma diferentes de las una o más proteína o proteínas de plasma que pueden ser capturadas por el primer adsorbente o por el segundo adsorbente;

- En una realización de la presente invención, uno o más factores de coagulación o factores de anti-coagulación tal como Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor de von Willebrand, complejo de Factor VIII- factor de von Willebrand, Factor IX, Factor X, Factor XI, inhibidor C1, proteína C y Proteína S, están unidos a un primer adsorbente. En una realización de la presente invención, al menos 2 de los factores de coagulación o anti-coagulación se unen al adsorbente, tal como al menos 3 de los factores de coagulación o anti-coagulación, p. ej., al menos 4 de los factores de coagulación o anti-coagulación, tal como al menos 5 de los factores de coagulación o anti-coagulación, p. ej., al menos 6 de los factores de coagulación o anti-coagulación, tal como al menos 7 de los factores de coagulación o anti-coagulación, p. ej., 8 de los factores de coagulación o anti-coagulación.
- 40

- 45 En otra realización de la presente invención al menos una de las proteínas seleccionadas de albúmina, IgG, transferrina, fibrinógeno están unidas a un segundo adsorbente. En una realización de la presente invención al menos 2 de las proteínas se unen al adsorbente, tal como al menos 3 de las proteínas, p. ej., 4 de las proteínas.

Aún en una realización de la presente invención, al menos una de las proteínas, el inhibidor de la α -1-proteinasa o la α -1-glicoproteína ácida, se une a un tercer adsorbente. En una realización de la presente invención 2 de las proteínas se unen al adsorbente.

- 50 En una realización adicional de la presente invención, las proteínas seleccionadas del grupo que consiste en IgG, albúmina, fibrinógeno, inhibidor de la proteinasa α -1, glicoproteína α -1 ácida y uno o más de los factores de coagulación o de anti-coagulación tales como Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, factor de von Willebrand, complejo Factor VIII-factor de von Willebrand, factor IX, factor X, factor XI, inhibidor C1, proteína C y/o proteína S, están aislados en al menos 2 fracciones proteínicas individuales, tal como 3 fracciones proteínicas individuales, p. ej., 4 fracciones proteínicas individuales, tal como 5 fracciones proteínicas individuales, p. ej., 6 fracciones proteínicas individuales. Además, se prefiere que el grado de contaminación cruzada de la proteína individual en la
- 55

fracción proteínica sea a lo sumo del 20%, tal como a lo sumo del 15%, p. ej., a lo sumo del 10%, tal como a lo sumo del 5%, p. ej., a lo sumo del 3%, a lo sumo del 1%, p. ej., a lo sumo del 0,5%, a lo sumo del 0,1%, p. ej., a lo sumo del 0,01%. Preferiblemente, las fracciones proteínicas individuales se obtienen dentro de un único círculo de adsorción.

5 Según la presente invención, una o más de las proteínas a aislar pueden aislarse mediante una de las siguientes:

(i) Una o más de las proteínas a aislar pueden lavarse a través del adsorbente sin unirse específicamente al adsorbente recogido en el tampón de lavado.

(ii) Una o más de las proteínas a aislar pueden unirse específicamente al adsorbente y posteriormente ser eluidas utilizando uno o más de los tampones de elución y ser recogidas en uno o más de los tampones de elución.

10 (iii) Una o más de las proteínas a aislar pueden ser lavadas a través de adsorbente y otra o más de las proteínas a aislar pueden estar específicamente unidas al adsorbente y ser recogidas en el tampón de lavado, y una o más de la proteína o proteínas de interés se pueden eluir posteriormente con uno o más tampones de elución y ser recogidas en uno o más de los tampones de elución.

15 En una realización de la presente invención, el fibrinógeno puede unirse al adsorbente y simultáneamente uno o más de los factores de coagulación o anti-coagulación tales como Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, factor de von Willebrand, complejo de Factor VIII-factor de von Willebrand, Factor IX, Factor X, Factor XI, inhibidor C1, proteína C y/o Proteína S pueden obtenerse como material no unido desde el adsorbente. Preferiblemente, al menos el 50% del fibrinógeno puede unirse al adsorbente, tal como al menos el 60%, p. ej., al menos el 70%, tal como al menos el 80%, p. ej., al menos el 90%, tal como al menos el 95%, p. ej., al menos el 98%.

20 En otra realización de la presente invención, albúmina e IgG pueden unirse al adsorbente y simultáneamente se puede obtener inhibidor de la proteinasa α -1 como material no unido desde el adsorbente. Posteriormente, se pueden obtener albúmina e IgG desde el adsorbente por elución escalonada. Preferiblemente, al menos el 50% de la albúmina puede unirse al adsorbente, tal como al menos el 60%, p. ej., al menos el 70%, tal como al menos el 80%, p. ej., al menos el 90%, tal como al menos el 95%, p. ej., al menos el 98%. Preferiblemente, al menos el 50% de la IgG puede unirse al adsorbente, tal como al menos el 60%, p. ej., al menos el 70%, tal como al menos el 80%, p. ej., al menos el 90%, tal como al menos el 95%, p. ej., al menos el 98%.

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

30 En otra realización de la presente invención, el fibrinógeno y la IgG pueden unirse al adsorbente y simultáneamente se puede obtener albúmina como material no unido desde el adsorbente. Posteriormente, se puede obtener fibrinógeno e IgG desde el adsorbente por elución escalonada. Preferiblemente, al menos el 50% de la IgG puede unirse al adsorbente, tal como al menos el 60%, p. ej., al menos el 70%, tal como al menos el 80%, p. ej., al menos el 90%, tal como al menos el 95%, p. ej., al menos el 98%. Preferiblemente, al menos el 50% del fibrinógeno puede unirse al adsorbente, tal como al menos el 60%, p. ej., al menos el 70%, tal como al menos el 80%, p. ej., al menos el 90%, tal como al menos el 95%, p. ej., al menos el 98%.

35 En otra realización de la presente invención, el fibrinógeno, la albúmina y la IgG pueden unirse al adsorbente y simultáneamente se puede obtener inhibidor de la proteinasa α -1 como material no unido desde el adsorbente. Posteriormente, se puede obtener fibrinógeno, albúmina e IgG desde el adsorbente por elución escalonada. Preferiblemente, al menos el 50% de la IgG puede unirse al adsorbente, tal como al menos el 60%, p. ej., al menos el 70%, tal como al menos el 80%, p. ej., al menos el 90%, tal como al menos el 95%, p. ej., al menos el 98%. Preferiblemente, al menos el 50% del fibrinógeno puede unirse al adsorbente, tal como al menos el 60%, p. ej., al menos el 70%, tal como al menos el 80%, p. ej., al menos el 90%, tal como al menos el 95%, p. ej., al menos el 98%. Preferiblemente, al menos el 50% de la albúmina puede unirse al adsorbente, tal como al menos el 60%, p. ej., al menos el 70%, tal como al menos el 80%, p. ej., al menos el 90%, tal como al menos el 95%, p. ej., al menos el 98%.

40 En otra realización de la presente invención, al menos 1, tal como al menos 2, p. ej., 3 de entre fibrinógeno, albúmina e IgG pueden unirse al adsorbente y simultáneamente se puede obtener glicoproteína α -1 ácida como material no unido desde el adsorbente. Posteriormente, se pueden obtener fibrinógeno, albúmina y/o IgG desde el adsorbente por elución escalonada. Preferiblemente, al menos el 50% de la IgG puede unirse al adsorbente, tal como al menos el 60%, p. ej., al menos el 70%, tal como al menos el 80%, p. ej., al menos el 90%, tal como al menos el 95%, p. ej., al menos el 98%. Preferiblemente, al menos el 50% del fibrinógeno puede unirse al adsorbente, tal como al menos el 60%, p. ej., al menos el 70%, tal como al menos el 80%, p. ej., al menos el 90%, tal como al menos el 95%, p. ej., al menos el 98%. Preferiblemente, al menos el 50% de la albúmina puede unirse al adsorbente, tal como al menos el 60%, p. ej., al menos el 70%, tal como al menos el 80%, p. ej., al menos el 90%, tal como al menos el 95%, p. ej., al menos el 98%.

55 En otra realización de la presente invención, al menos 1, tal como al menos 2, p. ej., 3 de entre fibrinógeno, albúmina

- e IgG pueden unirse al adsorbente y simultáneamente se puede obtener glicoproteína α -1 ácida y/o inhibidor de la proteinasa α -1 como material no unido desde el adsorbente. Posteriormente, se puede obtener fibrinógeno, albúmina y/o IgG desde el adsorbente por elución escalonada. Preferiblemente, al menos el 50% de la IgG puede unirse al adsorbente, tal como al menos el 60%, p. ej., al menos el 70%, tal como al menos el 80%, p. ej., al menos el 90%, tal como al menos el 95%, p. ej., al menos el 98%. Preferiblemente, al menos el 50% del fibrinógeno puede unirse al adsorbente, tal como al menos el 60%, p. ej., al menos el 70%, tal como al menos el 80%, p. ej., al menos el 90%, tal como al menos el 95%, p. ej., al menos el 98%. Preferiblemente, al menos el 50% de la albúmina puede unirse al adsorbente, tal como al menos el 60%, p. ej., al menos el 70%, tal como al menos el 80%, p. ej., al menos el 90%, tal como al menos el 95%, p. ej., al menos el 98%.
- 5 En una realización de la presente invención, al menos el 50% de inhibidor de la proteinasa α -1, albúmina, IgG, fibrinógeno o uno o más de los factores de coagulación o de anti-coagulación tales como Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, factor de von Willebrand, complejo de Factor VIII-factor de von Willebrand, Factor IX, Factor X, Factor XI, inhibidor de C1, proteína C y/o proteína S pueden obtenerse desde el adsorbente, tal como al menos el 60%, p. ej., al menos el 70%, tal como al menos el 80%, p. ej., al menos el 90%, tal como al menos el 95%, p. ej., al menos el 98%.
- 10 En una realización de la presente invención, la albúmina puede unirse al adsorbente y simultáneamente se puede obtener inhibidor de la proteinasa α -1 como material no unido desde el adsorbente. Preferiblemente, al menos el 50% de la albúmina puede unirse al adsorbente, tal como al menos el 60%, p. ej., al menos el 70%, tal como al menos el 80%, p. ej., al menos el 90%, tal como al menos el 95%, p. ej., al menos el 98%.
- 15 En una realización de la presente invención, se puede aislar el inhibidor de la proteinasa α -1 de una solución proteínica, mediante un procedimiento que comprende las etapas de (i) poner en contacto una solución acuosa de proteínas del plasma que contienen IgG, albúmina e inhibidor de la α -1-proteinasa con un adsorbente de intercambio aniónico en condiciones tales que la albúmina y el inhibidor de la alfa-1-proteinasa se unen al adsorbente y la IgG permanece no unida, en donde la solución proteínica se selecciona del grupo que consiste en sobrenadante I previamente tratado o sobrenadante II + III previamente tratado, sobrenadante I + II + III previamente tratado; (ii) recuperar, opcionalmente, la IgG no unida para obtener una fracción proteínica rica en IgG; (iii) eluir la albúmina del medio de intercambio aniónico para obtener una fracción proteínica rica en albúmina; y (iv) eluir del medio de intercambio aniónico para obtener una fracción proteínica rica en inhibidor de α -1-proteinasa.
- 20 En una realización adicional de la presente invención, la fracción proteínica no unida puede comprender la proteína o proteínas lavadas a través del adsorbente, tal como el inhibidor de la α -1-proteasa, la glicoproteína α -1 ácida, la albúmina, la IgG o el fibrinógeno con alto rendimiento. Preferiblemente, el rendimiento será mayor que el 70%, más preferiblemente mayor que el 80%, más preferiblemente mayor que el 90% del inhibidor de la alfa-1-proteasa.
- 25 Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento en donde dichas proteínas sean lavadas a través del adsorbente, tal como el inhibidor de la α -1-proteasa, glicoproteína α -1 ácida, albúmina, IgG o fibrinógeno presentes con alto rendimiento en la fracción proteínica no unida puede aislarse posteriormente de la fracción proteínica no unida mediante un tratamiento aguas abajo adicional, p. ej., empleando una segunda etapa de adsorción cromatográfica.
- 30 Una realización de la presente invención es proporcionar un procedimiento en donde se proporcionan múltiples fracciones proteínicas por cada ciclo de adsorción tal como al menos 2 fracciones proteínicas, p. ej., al menos 3 fracciones proteínicas, tal como al menos 4 fracciones proteínicas, p. ej., al menos 5 fracciones proteínicas, tal como al menos 6 fracciones proteínicas. Preferiblemente, cada una de estas fracciones proteínicas comprende un alto rendimiento de las proteínas individuales sin una significativa contaminación cruzada de la fracción o fracciones proteínicas entre las al menos 2 proteínas, tal como al menos 3 proteínas, p. ej., al menos 4 proteínas, tales como al menos 5 proteínas, p. ej., al menos 6 proteínas dentro de la misma fracción proteínica. En una realización de la presente invención, la cantidad de contaminación cruzada en una fracción proteínica es menor que el 20%, tal como menor que el 15%, p. ej., menor que el 10%, tal como menor que el 5%, p. ej., menor que el 3%, tal como menor que el 1%, p. ej., menor que el 0,5%, tal como menor que el 0,1%, p. ej., menor que el 0,01%.
- 35 En el presente contexto, la expresión "contaminación cruzada" se refiere a la cantidad o contenido de proteína que no interesa que está presente en la fracción proteínica. En algunos casos tiene interés eluir dos o más proteínas simultáneamente en un círculo de elución y, en este caso, las proteínas intencionadamente eluidas juntas no se consideran contaminantes. En una realización de la presente invención, el grado de contaminación cruzada de la proteína individual en la fracción proteínica es a lo sumo del 20%, tal como a lo sumo del 15%, p. ej., a lo sumo del 10%, tal como a lo sumo del 5%, p. ej., a lo sumo del 3%, a lo sumo del 1%, p. ej., a lo sumo del 0,5%, tal como a lo sumo del 0,1%, p. ej., a lo sumo del 0,01%.
- 40 La invención se ilustrará adicionalmente en las siguientes figuras, artículos y ejemplos no limitantes.
- 45 La Figura 1 ilustra el fraccionamiento escalonado global de proteínas de plasma humano por adición gradual de etanol para obtener una serie de sobrenadantes y precipitados que comprenden varias proteínas de plasma humano.
- 50
- 55

La Fig. 2 ilustra la diferencia entre una columna de adsorción de lecho empaquetado que comprende partículas adsorbentes estrechamente empaquetadas y una columna de adsorción de lecho expandido que comprende partículas adsorbentes, que son fluidizadas por un flujo ascendente de líquido. La columna de adsorción de lecho expandido todavía tiene flujo en pistón con un mínimo de retro-mezcla.

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

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

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

15 Ejemplos

Ejemplo 1

Separación de albúmina humana e inhibidor de alfa-1-proteasa de la fracción de Cohn (SUP I, II, III) por adsorción en lecho expandido.

Adsorbente

- 20 FastLine® UFC NNSDW n.º de cat. CS48, UpFront Chromatography A/S. El adsorbente se basó en agarosa con partículas de carburo de wolframio incorporadas, la densidad de las partículas de conglomerado era de 2,9 g/ml y el diámetro de partícula estaba en el intervalo de 40-120 µm con un diámetro de la partícula de volumen medio (D (4,3)) de 70 µm (determinado en el Mastersizer 2000E, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). El adsorbente comprendía ácido 2-mercaptónico como ligando y tenía una concentración de ligando de 40 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

Tratamiento previo de la solución proteínica

La solución proteínica comprendía una fracción de Cohn, Sobrenadantes I, II, III, Conductividad 5,74 mS, pH 7,2, comprendiendo aprox. 10% de etanol.

- 30 La solución proteínica se diluyó con agua desmineralizada en una proporción de un volumen de sobrenadantes I, II, III de Cohn, frente a 2 volúmenes de agua, y el pH se ajustó a pH 5,0 con ácido hidrocórico 1 M. La conductividad después de la dilución era de 3,8 mS.

Parámetros de procedimiento

El experimento se realizó en una columna de lecho expandido FastLine® 20 ($\phi = 2$ cm) con número de artículo 7020-0000, UpFront Chromatography A/S.

- 35 La columna se empaquetó con 50 cm de adsorbente (157 ml) y se equilibró a temperatura ambiente (20-25 °C) con 160 ml de NaOH 1 M (primer tampón de equilibrio), 400 ml de tampón de pH 4,5 de citrato de sodio 40 mM (segundo tampón de equilibrio), y 400 ml de tampón de pH 5,0 de citrato de sodio 40 mM (tercer tampón de equilibrio).

Se realizaron dos experimentos con un caudal lineal de 450 cm/h:

- (i) Experimento A). En la columna se cargaron 236 ml de solución proteínica diluida
40 (ii) Experimento B). En la columna se cargaron 353 ml de solución proteínica diluida tres veces

Fracción 1: El material no unido se retiró por lavado de la columna con tampón de pH 5,0, de ácido cítrico 10 mM. El inhibidor de alfa-1-proteasa se recogió en la fracción de lavado. Las proteínas unidas se eluyeron posteriormente en dos etapas.

- 45 - Fracción 2, primera etapa de elución: se eluyó la Albúmina Humana con 5 mg/ml de octanoato de sodio (caprilato de sodio), pH 6,0.
- Fracción 3, segunda etapa de elución: se eluyeron otras proteínas, incluidas IgG y transferrina, con citrato de sodio 0,3 M, pH 7,4.

Resultados

La siguiente tabla muestra los volúmenes de solución proteínica y tampones cargados en cada columna:

Fracción	Serie A	Serie B
Primer tampón de equilibrio	160 ml	160 ml
Segundo tampón de equilibrio	400 ml	400 ml
Tercer tampón de equilibrio	400 ml	400 ml
Fracción proteínica 1 Volumen de lavado (inhibidor de proteasa alfa 1)	750 ml	815 ml
Fracción proteínica 2 Elución de albúmina humana	500 ml	520 ml
Fracción proteínica 3 Elución de IgG y transferrina	350 ml	390 ml

5 Cuantificación del inhibidor de la alfa-1-proteasa y de la albúmina humana en las fracciones 1, 2 y 3. Se realizó la Inmunodifusión Radial Simple (SRI) con el fin de cuantificar el rendimiento relativo en tanto por ciento de inhibidor de alfa-1-proteasa y albúmina humana en las fracciones a partir de la columna descrita en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Supl. 10, 41-56, 1983.

El SRI se realizó con: Inhibidor de la alfa-1-proteasa antihumana de conejo de Dako Cytomation, Dinamarca, n.º de cat. A0012 (0,6 µl por cm²) y albúmina antihumana de conejo de Dako Cytomation, Dinamarca, n.º de cat. A001 (0,3 µl por cm²).

10 Se realizó una curva patrón con la solución proteínica cargada en la columna en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. Cada una de las tres fracciones se interpretó con respecto a la curva patrón.

Resultados:

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

Determinación del inhibidor de la alfa-1-proteasa humana

Serie	Fracción proteínica 1 - Material no unido	Fracción proteínica 2 - Primer eluato	Fracción proteínica 3 - Segundo eluato
Serie A	80%	0%	0%
Serie B	80%	0%	0%

15

Determinación de albúmina humana

Serie	Fracción 1- Material no unido	Fracción 2- Primer eluato	Fracción 3 - Segundo eluato
Serie A	0%	95%	0%
Serie B	0%	95%	0%

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

SDS-PAGE

20 Para la SDS-PAGE, se utilizó gel 4-20% de Tris-Glicina Invitrogen SDS-Page (n.º de cat. EC6025). Preparación de la muestra: 25 µl de muestra y 25 µl de tampón de muestra tris-glicina Invitrogen (n.º de cat. LC2676) se mezclaron y se sometieron a ebullición durante 5 minutos en un baño de agua. Se añadió tampón de migración tris 0,024 M (Sigma T1378), glicina 0,19 M (Merck 5001901000), SDS 0,1% (dodecilsulfato de sodio, JT Baker 2811) pH 8,6.

25 Se aplicó una muestra de 20 µl en cada franja de análisis y la corriente se ajustó para dar una intensidad de 40 mA. Cuando la línea azul del tampón muestra alcanzó un cm desde el fondo del gel, se cortó la corriente y el gel se tiñó durante la noche en un kit de tinción azul coloidal Invitrogen (n.º de cat. LC 6025) en una mesa de agitación. Al día siguiente, el gel se transfirió a agua y se destiñó en agua durante 2 horas.

Resultados:

No se pudo detectar ninguna descomposición ni desnaturalización del inhibidor de la alfa-1-proteasa humana (alfa-1-PI) o de las moléculas de albúmina humana por electroforesis en gel con dodecil-sodio (SDS-PAGE). Se encontró que la pureza de la albúmina humana eluida era mayor del 95% según se determinó mediante SDS-PAGE.

5 En la fracción 1 se recuperó el alfa-1-PI

En la fracción 2 se recuperó la albúmina humana unida.

En la Fracción 3 se recuperaron la inmunoglobulina G y la transferrina unidas.

Ejemplo 2

10 Separación de la albúmina humana e inhibidor de alfa-1-proteasa a partir de la fracción de Cohn (SUP I, II y III) por adsorción en lecho expandido a diferentes valores de pH.

Adsorbente

FastLine[®] UFC NNSDW, n.º de cat. CS48, UpFront Chromatography A/S. Véase el ejemplo 1.

Tratamiento previo de la solución proteínica

15 La solución proteínica comprendía una fracción de Cohn Sobrenadante I, II, III, conductividad 5,74 mS, pH 7,2, que comprendía aproximadamente 10% de etanol.

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

Parámetros de procedimiento:

20 El experimento se realizó en una columna de lecho expandido FastLine[®] 20 ($\phi = 2$ cm), número de artículo 7020-0000, UpFront Chromatography A/S.

25 Se realizaron tres experimentos con un caudal lineal de 450 cm/h. La columna estaba empaquetada con 50 cm de adsorbente (157 ml) y equilibrada a temperatura ambiente (20-25 °C) con 160 ml de NaOH 1 M (primer tampón de equilibrio), 400 ml de tampón de pH 4,5 de citrato de sodio 40 mM (segundo tampón de equilibrio) seguido de equilibrado con un tercer tampón (tercero tampón de equilibrio) que comprende:

Experimento A: 400 ml de tampón de citrato de sodio 40 mM, pH 5,0

Experimento B: 400 ml de tampón de citrato de sodio 40 mM, pH 5,3

Experimento C: 400 ml de tampón de citrato de sodio 40 mM pH 5,5

Se ajustaron 240 ml de solución proteínica diluida con HCl 1 M para:

30 Experimento A: pH 5,0, conductividad = 2,16 mS

Experimento B: pH 5,3, conductividad = 2,27 mS

Experimento C: pH 5,5, conductividad = 2,29 mS

Después de ajustar el pH, se cargó la solución proteínica en la columna.

35 Fracción 1: El material no unido se retiró por lavado con tampón pH 5,0 de citrato de sodio 10 mM. El inhibidor alfa-1-proteasa se recogió en la fracción de lavado de la columna.

Las proteínas unidas se eluyeron en dos etapas.

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

- Fracción 3, segunda etapa de elución: se eluyeron otras proteínas, incluidas la IgG y la transferrina, con citrato de sodio 0,3 M, pH 7,4.

40 Resultados

La tabla siguiente muestra los volúmenes de solución proteínica y tampones cargados en cada columna:

Cuantificación del inhibidor de alfa-1-proteasa y albúmina humana en las fracciones 1, 2 y 3

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

Se realizó Inmunodifusión Radial Simple (SRI) con el fin de cuantificar el rendimiento relativo en tanto por ciento de inhibidor de la alfa-1-proteasa y albúmina humana en las fracciones de la columna (véase el ejemplo 1)

Resultados:

- 5 La siguiente tabla muestra el rendimiento relativo en tanto por ciento de la solución proteínica cargada en la columna:

Determinación del inhibidor de la alfa-1-proteasa

Serie	Fracción proteínica 1 - Material no unido	Fracción proteínica 2 - Primer eluato	Fracción proteínica 3 - Segundo eluato
Serie A	60%	0%	0%
Serie B	80%	0%	0%
Serie C	Sin datos	Sin datos	Sin datos

Determinación de albúmina humana

Serie	Fracción proteínica 1 - Material no unido	Fracción proteínica 2 - Primer eluato	Fracción proteínica 3 - Segundo eluato
Serie A	0%	95%	0%
Serie B	20%	80%	0%
Serie C	Sin datos	Sin datos	Sin datos

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

- 10 SDS-PAGE (Véase el experimento 1)

Resultados:

No se pudo detectar ninguna descomposición ni desnaturalización de las moléculas del inhibidor de la alfa-1-proteasa o de la albúmina por SDS-PAGE. Se encontró que la pureza de la albúmina humana eluida era mayor del 95% según se determinó mediante SDS-PAGE.

- 15 Ejemplo 3

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

Adsorbente

Intercambiador de iones FastLine® DEAE n.º de cat. CS62, UpFront Chromatography A/S. El adsorbente se basó en

agarosa con partículas de carburo de wolframio incorporadas, la densidad de las partículas de conglomerado era de 2,9 g/ml y el diámetro de partícula estaba en el intervalo de 40-120 µm con un diámetro medio de partícula de 70 µm. El adsorbente comprendía grupos dietilaminoetilo (DEAE) como ligando y una concentración de ligando de 150 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

5 Solución proteínica

La fracción proteínica 1 (el material no unido) a partir de la separación de albúmina e inhibidor de la proteinasa alfa 1 como se describe en el ejemplo 1, experimento A. El pH en la fracción proteínica se ajustó a pH 8,2 con NaOH 1M. La conductividad en adelante era de 6,16 mS.

Parámetros de procedimiento

10 El experimento se realizó en columnas Poly-Prep, número de artículo 731-1550, BioRad.

La columna se empaquetó con 1 ml de intercambiador de iones y se equilibró a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 30 minutos con 5 ml de fosfato de potasio 1M, pH 8,2. Después de la incubación, el intercambiador de iones se lavó con 10 ml de fosfato de potasio 10 mM, pH 8,2.

15 Se ajustaron 30 ml de la fracción proteínica a pH 8,2 y se cargaron en la columna, y las fracciones ejecutadas se recogieron en fracciones de 5 ml. Después de la carga de la fracción proteínica la columna se lavó con 10 ml de fosfato de potasio 10 mM, pH 8,2.

El inhibidor de la alfa-1-proteasa unida se eluyó con fosfato de potasio 10 mM + NaCl 1M hasta pH 8,2.

Resultados

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

20 Cuantificación del inhibidor de la alfa-1-proteasa humana

Fracción	10
	30 ml
Fracción proteínica	
Volumen de fracciones ejecutadas	6 x 5 ml
Fracción de lavado	10 ml
Inhibidor de alfa-1-proteasa, eluato	10 ml

Se realizó Inmunodifusión Radial Simple (SRI) con el fin de cuantificar el rendimiento relativo en tanto por ciento de inhibidor de la alfa-1-proteasa en las fracciones de la columna según se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Supl. 10, 41-56, 1983.

25 La RDI se realizó con: Inhibidor de la proteasa alfa-1 anti-humana de conejo de Dako Cytomation, Dinamarca, n.º de cat.: A0012 (0,6 µl por cm²).

Se realizó una línea estándar con la fracción proteínica cargada en la columna en concentraciones de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. Cada una de las fracciones se interpretó con respecto a la curva patrón.

Resultados:

30 La tabla siguiente muestra el rendimiento relativo del inhibidor de la alfa-1-proteasa en tanto por ciento de la fracción proteínica cargada en la columna:

Determinación del inhibidor de la alfa-1-proteasa humana

Fracción	Rendimiento relativo
Fracción proteínica 1 ejecutada	0%
Fracción proteínica 2 ejecutada	0%
Fracción proteínica 3 ejecutada	0%
Fracción proteínica 4 ejecutada	0%
Fracción proteínica 5 ejecutada	0%

Fracción proteínica 6 ejecutada	0%
Lavado	0%
Eluato	80%

De este modo, no se encontró inhibidor de alfa-1-proteasa en las fracciones proteínicas no unidas, mientras que se encontró en el eluato un 80% del inhibidor de alfa-1-proteasa cargado en la columna.

Ejemplo 4

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

- 5 El ejemplo 3 se repitió esta vez utilizando, sin embargo, una columna de adsorción en lecho expandido que utiliza el mismo adsorbente de intercambio iónico a una altura de lecho sedimentado de 5 cm y un caudal lineal de 5 cm/min.

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

Ejemplo comparativo 5

- 10 Aislamiento de proteínas del plasma humano a partir de plasma humano utilizando adsorción en lecho expandido con un caudal de 450 cm/h.

Adsorbente

- 15 FastLine® UFC NNSDW n.º de cat. CS48, UpFront Chromatography A/S. El adsorbente se basó en agarosa con partículas de carburo de wolframio incorporadas, la densidad de las partículas de conglomerado era de 2,9 g/ml y el diámetro de partícula estaba en el intervalo de 40-120 µm con un diámetro medio de partícula de 70 µm. El adsorbente comprendía ácido 2-mercaptónico como ligando y una concentración de ligando de 40 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

Tratamiento previo de la solución proteínica

- 20 La solución proteínica se diluyó con agua desmineralizada en una proporción de un volumen de plasma humano frente a 2 volúmenes de agua y el pH se ajustó a pH 5,0 con ácido hidrocórico 1 M. La conductividad era a continuación de 5,25 mS/cm².

Parámetros de procedimiento:

El experimento se realizó en una columna de lecho expandido FastLine® 20 ($\phi = 2$ cm), número de artículo 7020-0000, UpFront Chromatography A/S.

- 25 La columna se cargó con adsorbente para alcanzar una altura de lecho sedimentado (H_0) de 50 cm (correspondiente a 157 ml de adsorbente) y se lavó y se equilibró a 20-25 °C con los siguientes tampones en orden sucesivo ¹⁾ 160 ml de NaOH 1 M, ²⁾ 400 ml de tampón de pH 4,53 de ácido cítrico 40 mM y ³⁾ 400 ml de tampón de pH 5,0 de ácido cítrico 40 mM.

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

Muestra:

En la columna se cargaron 120 ml de solución proteínica (correspondientes a 40 ml de plasma sin diluir).

Recogida de Fracciones:

- 35 Después de la carga de la solución proteínica, el material no unido y el débilmente unido se retiraron por lavado de la columna con citrato de sodio 10 mM, pH 5,0.

La fracción 1 (fracción no unida) se recogió como una fracción según la monitorización UV del efluente de la columna.

Posteriormente, las proteínas unidas se eluyeron en tres etapas secuenciales.

- Fracción 2 - primera etapa de elución, se realizó con caprilato de sodio 5 mg/ml, pH 6,0.
- 40 - Fracción 3 - segunda etapa de elución, se realizó con citrato de sodio 0,3 M, pH 7,4.
- Fracción 4 - tercera etapa de elución, se realizó con citrato de sodio 20 mM + NaCl 0,1 M, pH 7,4.

Entre la primera y la segunda etapa de elución, la columna se lavó brevemente con 1 volumen de columna de citrato de sodio 1 M, pH 7,4.

Resultados

La siguiente tabla muestra los volúmenes de cada fracción:

5 Cuantificación de las proteínas de plasma humano, fracciones 1, 2, 3 y 4 de la columna

Fracción	Serie
Tampón de equilibrio ¹	160 ml
Tampón de equilibrio ²	400 ml
Tampón de equilibrio ³	400 ml
Fracción proteínica 1 - Proteínas no unidas y lavado	900 ml
Fracción proteínica 2	550 ml
Fracción proteínica 3	560 ml
Fracción proteínica 4	370 ml

Se realizó Inmunodifusión Radial Simple (ISR) con el fin de mostrar los componentes en cada fracción de la columna como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Supl. 10, 41-56, 1983.

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

Anticuerpo	Código n.º	µl de muestra/pocillo	µl por cm ²
Albúmina antihumana de conejo	A 0001	5 µl	0,30 µl por cm ²
IgG antihumana de conejo	A 0424	5 µl	0,30 µl por cm ²
Alfa-1-PI antihumano de conejo	A 0012	5 µl	0,60 µl por cm ²
Fibrinógeno antihumano de conejo	A 0080	5 µl	0,40 µl por cm ²
Haptoglobina antihumana de conejo	A 0030	15 µl	0,45 µl por cm ²
Globulina GC antihumana de conejo	A 0021	15 µl	0,60 µl por cm ²
IgM antihumana de conejo	A 0426	15 µl	0,40 µl por cm ²
IgA antihumana de conejo	A 0092	15 µl	0,50 µl por cm ²
Macroglobulina alfa-2 antihumana de conejo	A 0033	15 µl	0,40 µl por cm ²
Orosomucoide antihumana de conejo	A 0011	5 µl	0,80 µl por cm ²
Transferrina antihumana de conejo	A 0061	5 µl	0,30 µl por cm ²
Prealbúmina antihumana de conejo	A 0002	15 µl	0,75 µl por cm ²
Antitrombina III antihumana de conejo	A 0296	25 µl	0,50 µl por cm ²

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

Resultados

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

	Fracción proteínica 1 Material no unido	Fracción proteínica 2	Fracción proteínica 3	Fracción proteínica 4
Albúmina humana	-	100%	-	-
IgG humana	-	-	95%	5%

	Fracción proteínica 1 Material no unido	Fracción proteínica 2	Fracción proteínica 3	Fracción proteínica 4
Alfa-1-PI humana	90%	-	-	-
Fibrinógeno humano	-	-	20%	60-80%
Haptoglobina humana	40%	40%	20%	-
Globulina GC humana	-	100%	-	-
IgM humana	-	-	80%	-
IgA humana	10%	20%	70%	-
Macroglobulina alfa-2 humana	-	40%	40%	-
Orosomucoide humana	100%	-		-
Transferrina humana	-	-	100%	-
Prealbúmina humana	40%	-	-	-
Antitrombina III humana	-	80%	-	-
"-" = rendimiento relativo inferior al 5%				

Ejemplo comparativo 6

Aislamiento de proteínas de plasma humano a partir de plasma humano tratado con etanol utilizando adsorción en lecho expandido con un caudal de 450 cm/h.

Adsorbente

- 5 FastLine® UFC NNSDW n.º de cat. CS48, UpFront Chromatography A/S. El adsorbente se basó en agarosa con partículas de carburo de wolframio incorporadas, la densidad de las partículas de conglomerado era de 2,9 g/ml y el diámetro de partícula estaba en el intervalo de 40-120 µm con un diámetro medio de partícula de 70 µm. El adsorbente comprendía ácido 2-mercaptónico como ligando y una concentración de ligando de 40 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

10 Tratamiento previo de la solución proteínica

El plasma humano se ajustó a 8% de etanol en volumen con etanol del 99% a -3 °C y se incubó a -3 °C durante 1,5 horas. Después de la incubación, el plasma se centrifugó durante 10 minutos. El sobrenadante se diluyó en agua desmineralizada en una proporción de 1 parte de plasma frente a dos partes de agua y el pH se ajustó a pH 5,0 con ácido hidroclicórico 1 M. La conductividad era a continuación de 4,16 mS/cm².

15 Parámetros del procedimiento, volumen de la muestra y fracciones

Todos los parámetros y condiciones del procedimiento fueron idénticos a los aplicados en el ejemplo comparativo 5.

Resultados

La siguiente tabla muestra los volúmenes de cada fracción:

Cuantificación de las fracciones 1, 2, 3 y 4 de las proteínas de plasma humano a partir de la columna.

- 20 El Análisis por SRI se realizó como en el ejemplo comparativo 5.

Fracción	Serie
Tampón de equilibrio ¹	160 ml
Tampón de equilibrio ²	400 ml
Tampón de equilibrio ³	400 ml
Fracción proteínica 1 Proteínas no unidas y lavadas	900 ml
Fracción proteínica 2	530 ml
Fracción proteínica 3	570 ml

Fracción	Serie
Fracción proteínica 4	250 ml

Resultados

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

	Fracción proteínica 1 Material no unido	Fracción proteínica 2	Fracción proteínica 3	Fracción proteínica 4
Albúmina humana	-	100%	-	-
IgG humana	-	-	95%	5%
Alfa-1-PI humana	90%	-	-	-
Fibrinógeno humano	-	-	20%	60%
Haptoglobina humana	40%	40%	20%	-
Globulina GC humana	-	100%	-	-
IgM humana	-	-	60%	-
IgA humana	10%	20%	60%	-
Macroglobulina alfa-2 humana	-	50%	20%	-
Orosomucoide humana	100%	-	-	-
Transferrina humana	-	-	100%	-
Prealbúmina humana	40%	20%-	-	-
Antitrombina III humana	-	80%	-	-
"- " = rendimiento relativo inferior al 5%				

Ejemplo comparativo 7

- 5 Aislamiento del inhibidor de la alfa-1-proteasa humana (API) a partir de la fracción no unida del ejemplo comparativo 5.

Adsorbente

Intercambiador de iones FastLine® DEAE n.º de cat. CS62, UpFront Chromatography A/S.

- 10 El intercambiador de iones se basó en agarosa al 4% con partículas de carburo de wolframio incorporadas. Los gránulos de conglomerado tenían una densidad de aproximadamente 2,9 g/ml y un tamaño de partícula en el intervalo de 40-120 µm con un tamaño medio de partícula (diámetro) de 70 µm. El adsorbente comprendía grupos DEAE (dietilaminoetil-) y una concentración de aprox. 150 milimoles por litro de adsorbente sedimentado

Solución proteínica

- 15 El material de partida para este experimento era la fracción proteínica 1 (el material no unido) obtenida del aislamiento de proteínas de plasma humano utilizando adsorción en lecho expandido como se describe en el ejemplo comparativo 5. El pH en la fracción proteínica se ajustó cuidadosamente a pH 8,2 con NaOH 1M. La conductividad era de aquí en adelante 5,15 mS/cm².

Parámetros del procedimiento:

- 20 El experimento se realizó como experimentos en lecho empaquetado en columnas Poly-Prep, número de artículo 731-1550, BioRad, EE.UU.

Todas las etapas se realizaron a un caudal de 1 ml/minuto.

La columna se empaquetó con 1 ml de intercambiador de iones DEAE y se equilibró, a 20-25 °C, con 5 ml de K₂HPO₄ 1M ajustado a pH 8,2 con NaOH 1M. Después del equilibrado, el intercambiador de iones se lavó con 10 ml de fosfato de potasio 10 mM pH 8,2.

Se cargaron 50 ml de la materia prima ajustada a pH 8,2 en la columna y se recogieron las fracciones ejecutadas (material no unido) en fracciones de 10 ml. Después de la carga de la materia prima, la columna se lavó con 10 ml de K₂HPO₄ 10 mM, ajustado a pH 8,2

- 5 Después de cargar y lavar, el inhibidor de la proteínasa alfa 1 unida (alfa-1-PI) se liberó y se eluyó con fosfato de potasio 10 mM + NaCl 1 M, pH 8,2.

Resultados

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

Cuantificación de la alfa-1-PI humano de la columna

Fracción	Volumen
Fracción proteínica	50 ml
Fracciones ejecutadas	5 x 10 ml
Fracción de lavado	10 ml
Alfa-1-PI humano, eluato	10 ml

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

La SRI se realizó con API anti-humana de conejo de Dako Cytomation, Dinamarca, n.º de cat. A0012 (0,6 µl por cm²).

- 15 Se realizó una curva patrón con la fracción proteínica (la de 100% de referencia) cargada en la columna en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. La concentración de alfa-1-PI en cada una de las fracciones se determinó frente a la curva patrón y el rendimiento relativo en esa fracción se calculó a partir del volumen de la fracción con respecto al volumen y concentración de alfa-1-PI en la fracción proteínica aplicada.

Resultados

La tabla siguiente muestra el rendimiento relativo en tanto por ciento de la alfa-1-PI total cargada en la columna:

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

Fracción	
Fracción proteínica 1 ejecutada	0%
Fracción proteínica 2 ejecutada	0%
Fracción proteínica 3 ejecutada	0%
Fracción proteínica 4 ejecutada	5%
Fracción proteínica 5 ejecutada	7%
Lavado	<5%
Eluato	85%

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

SDS-PAGE

Para la SDS-PAGE, se utilizó gel de 4-20% de Tris-Glicina Invitrogen SDS-Page (n.º de cat. EC6025).

- 25 La demostración de la actividad de unión a la elastasa del alfa-1-PI en la fracción proteínica (fracción 1, ejemplo comparativo 5) se realizó analizando la fracción proteínica con SDS-PAGE antes y después de la incubación con elastasa (código n.º E0127 de Sigma). La fracción proteínica se ajustó a pH 7 con NaOH 0,2 M y a 500 µl de la fracción proteínica se añadieron 6,5 µl de elastasa 2,5 mg/ml y se incubaron durante 30 min a 30 °C

- 30 Preparación de la muestra: 25 µl de muestra y 25 µl de tampón muestra de Tris-glicina Invitrogen (n.º de cat. LC2676) se mezclaron y se sometieron a ebullición durante 5 minutos en un baño de agua. Se añadió el tampón de migración tris (Sigma T1378) 0,024 M, glicina 0,19 M (Merck 5001901000), SDS al 0,1% (dodecilsulfato de sodio, JT Baker 2811), pH 8,6.

Se aplicó una muestra de 20 µl en cada franja de análisis y se ajustó la corriente para que diera una intensidad de 40 mA. Cuando la línea azul del tampón muestra alcanzó un cm desde el fondo del gel, se cortó la corriente y el gel se tiñó durante la noche en un kit de tinción de azul coloidal Invitrogen (n.º de cat. LC 6025) en una mesa de agitación. Al día siguiente, el gel se transfirió al agua y se destiñó en agua durante 2 horas.

5 Resultados

El resultado mostró que el eluato de alfa-1-PI del intercambiador de iones DEAE tiene un alto grado de pureza según se estimó mediante SDS-PAGE (estimado en >80%). Véase también la fig. 3.

Además, el resultado también mostró que sustancialmente todo el inhibidor de la proteinasa alfa 1 en la fracción proteínica (fracción no unida del ejemplo comparativo 5) era activo y capaz de unirse a la elastasa. Véase también la fig. 4

Ejemplo comparativo 8

Aislamiento de la API humana y de la orosomucoide humana (alfa-1-glicoproteína ácida) de la fracción no unida en el ejemplo comparativo 5.

Adsorbente

15 Tamaño de partícula (diámetro) en el intervalo de 80-150 µm. Los adsorbentes basados en gránulos de agarosa al 6% se entrecruzaron y se activaron con epíclorhidrina antes del acoplamiento de los siguientes ligandos:

Experimento n.º	Ligando
1	2-hidroxi-piridina (45 micromoles/ml adsorbente)
2	4-bencil-oxifenol (40 micromoles/ml adsorbente)
3	2-amino-piridina (40 micromoles/ml adsorbente)
4	1,8-diamino-octano (50 micromoles/ml adsorbente)
5	Bencilamina (35 micromoles/ml adsorbente)
6	2,5-dimercapto-1,3,4-tiadiazol (65 micromoles/ml adsorbente)
7	N-octilamina (70 micromoles/ml adsorbente)

Solución proteínica

Fracción proteínica 1 (el material no unido) a partir del aislamiento de proteínas del plasma humano utilizando la absorción en lecho expandido del ejemplo comparativo 5. A la fracción proteínica se añadió sulfato de amonio hasta una concentración final de sulfato de amonio 2 M seguido por un ajuste cuidadoso a pH 8,2 con NaOH 1 M.

Parámetros del procedimiento

Los experimentos se realizaron como adsorción en lecho empaquetado en columnas Poly-Prep, número de artículo 731-1550, BioRad, EE.UU. El caudal era de 1 ml/min en todas las etapas.

25 Cada una de las columnas estaba empaquetada con 1 ml de adsorbente y el adsorbente se lavó en la columna sucesivamente con ¹⁾ 5 ml de agua desmineralizada y ²⁾ 4 ml de sulfato de amonio 2 M, pH 8,2.

30 Se cargaron 15 ml de fracción proteínica en cada columna y las fracciones ejecutadas (material no unido) se recogieron en dos fracciones. Después de la carga de la fracción proteínica, las columnas se lavaron sucesivamente con ¹⁾ 5 ml de sulfato de amonio 2 M, pH 8,2, ²⁾ 5 ml de sulfato de amonio 1 M, pH 8,2. Después del lavado, el adsorbente se eluyó con 10 ml de tampón de fosfato de potasio 10 mM pH 8,2 + NaCl 0,1 M (excepto para el experimento 5, donde el pH del tampón era de pH 5,0). Las fracciones de lavado y elución se recogieron como fracciones individuales para análisis.

Resultados

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

35

Cuantificación de la alfa-1-PI humana y la orosomucoide humana (alfa-1-glicoproteína ácida) del experimento 1 al 7

Fracción proteínica aplicada	Fracción proteínica 1 ejecutada	Fracción proteínica 1 ejecutada	Lavado 1	Lavado 2	Eluato
15 ml	5 ml	10 ml	5 ml	5 ml	10 ml

Se realizó Inmunodifusión Radial Simple (SRI) con el fin de cuantificar la concentración relativa en tanto por ciento de proteínas específicas en las fracciones obtenidas como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Supl. 10, 41-56, 1983.

5 La SRI se realizó con los siguientes anticuerpos:

- Alfa-1-PI antihumano de conejo, Dako Cytomation, Dinamarca, n.º de cat. A0012 (0,6 µl por cm²),
- Orosomucoide antihumana de conejo, Dako Cytomation, Dinamarca, n.º de cat. A0011 (0,8 µl por cm²)

10 Se realizó una curva patrón con la fracción proteínica cargada en la columna (no diluida = la referencia del 100%) en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. La concentración relativa de las proteínas específicas en las fracciones recogidas se determinó frente a la curva patrón. El rendimiento relativo de las proteínas específicas en cada fracción se calculó a partir del volumen de la fracción con respecto a la cantidad total de la proteína aplicada a la columna.

Determinación de la pureza de alfa-1-PI eluida (inhibidor de la proteínasa alfa 1) con SDS-PAGE

Para la SDS-PAGE, se utilizó gel 4-20% de Tris-Glicina de Invitrogen SDS-Page (n.º de cat. EC6025).

15 Preparación de la muestra: Se mezclaron 25 µl de muestra y 25 µl de tampón muestra Tris-glicina Invitrogen (n.º de cat. LC2676) y se sometieron a ebullición durante 5 minutos en un baño de agua. Se añadió tampón de migración 0,024 M tris (Sigma T1378), 0,19 M glicina (Merck 5001901000), SDS al 0,1% (dodecilsulfato de sodio, JT Baker 2811) pH 8,6.

20 Se aplicó una muestra de 20 µl en cada franja de análisis y la corriente se ajustó para dar una intensidad de 40 mA. Cuando la línea azul del tampón muestra alcanzó un cm desde el fondo del gel, se cortó la corriente y el gel se tiñó durante la noche en un kit de tinción azul coloidal Invitrogen (n.º de cat. LC 6025) en una mesa de agitación. Al día siguiente, el gel se transfirió al agua y se destiñó en agua durante 2 horas.

Resultados

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

Determinación de alfa-1-PI humana y de Orosomucoide humana (alfa-1-glicoproteína ácida). Rendimiento respecto a la cantidad total de proteína aplicada

Experimento n.º	Fracción 1 ejecutada	Fracción 2 ejecutada	Lavado 1	Lavado 2	Eluato
Ligando: 2-hidroxi-piridina					
1	alfa-1-PI	-	-	-	60%
	Orosomucoide	20%	80%	-	-
Ligando: 4-bencil-oxifenol					
2	alfa-1-PI	-	-	-	30%
	Orosomucoide	-	-	-	60%
Ligando: 2-amino-piridina					
3	alfa-1-PI	40%	60%	-	-
	Orosomucoide	40%	60%	-	-

Experimento n.º	Fracción 1 ejecutada	Fracción 2 ejecutada	Lavado 1	Lavado 2	Eluato
Ligando: 1,8-diamino-octano					
4	alfa-1-PI	-	20%	-	20%
	Orosomucoide	40%	60%	-	-
Ligando: bencilamina					
5	alfa-1-PI	-	-	-	60%
	Orosomucoide	20%	25%	-	60%
Ligando: 2,5-dimercapto-1,3,4- tiadiazol					
6	alfa-1-PI	-	-	-	90%
	Orosomucoide	15	40	-	40
Ligando: N-octilamina					
7	alfa-1-PI	-	-	-	-
	Orosomucoide	-	-	-	-
"- " = rendimiento relativo inferior a 5%.					

Tratamiento adicional aguas abajo

Concentración del eluato del experimento 5 (bencilamina como ligando) por ultrafiltración seguida de dos etapas de inactivación vírica: 1) tratamiento con disolvente-detergente y 2) filtración vírica (nanofiltración) proporcionan un producto adecuado para uso terapéutico.

5 Ejemplo comparativo 9

Aislamiento del API humano y de la orosomucoide humana (alfa-1-glicoproteína ácida).

Adsorbente

El tamaño de partícula (diámetro) estaba en el intervalo de 80-150 µm. Los adsorbentes se basaron en gránulos de agarosa al 6% entrecruzados y activados con epíclorhidrina antes del acoplamiento de los siguientes ligandos:

Experimento n.º	Ligando
1	2-hidroxi-piridina, (45 micromoles/ml adsorbente)
2	4-bencil-oxifenol, (40 micromoles/ml adsorbente)
3	2,5-dimercapto-1,3,4-tiadiazol, (65 micromoles/ml adsorbente)

10 Solución proteínica

Fracción proteínica 1 (el material no unido) a partir del aislamiento de proteínas del plasma humano utilizando la absorción en lecho expandido del ejemplo comparativo 5. A la fracción proteínica se añadió sulfato de amonio hasta una concentración final de sulfato de amonio 2 M seguido por un ajuste cuidadoso a pH 8,2 con NaOH 1 M.

Parámetros del procedimiento

15 Los experimentos se realizaron como adsorción en lecho empaquetado en columnas Poly-Prep, número de artículo 731-1550, BioRad, EE.UU. El caudal era de 1 ml/min en todas las etapas.

Cada una de las columnas estaba empaquetada con 1 ml de adsorbente y el adsorbente se lavó en la columna sucesivamente con ¹⁾ 5 ml de agua de intercambio iónico y ²⁾ 4 ml de sulfato de amonio 2 M pH 8,2.

Se cargaron 75 ml de fracción proteínica en cada columna y se recogieron las fracciones ejecutadas en cinco

fracciones de 15 ml cada una.

Experimento 1 y 2: Después de la carga de la fracción proteínica, las columnas se lavaron con 5 ml de sulfato de amonio 2 M pH 8,2 y se eluyeron con 10 ml de tampón fosfato de potasio 10 mM pH 8,2, NaCl 0,1 M.

- 5 Experimento 3: Después de la carga de la fracción proteínica, la columna se lavó sucesivamente con ¹⁾ 5 ml de sulfato de amonio 2 M pH 8,2 ²⁾ 5 ml de sulfato de amonio 1 M pH 8,2. Después del lavado, el adsorbente se eluyó con 10 ml de tampón de fosfato de potasio 10 mM, pH 8,2, NaCl 0,1 M.

Resultados

La siguiente tabla muestra los volúmenes de la fracción proteínica y los tampones cargados en las columnas en el experimento 1-3

- 10 Cuantificación de la alfa-1-PI humana y la Orosomucoide humana (alfa-1-glicoproteína ácida) del experimento 1 al 7

Experimento	Fracción proteínica	Fracciones proteínicas 1-5 ejecutadas	Lavado 1	Lavado 2	Eluato
1	75 ml	15 ml	5 ml	No realizado	10 ml
2	75 ml	15 ml	5 ml	No realizado	10 ml
3	75 ml	15 ml	5 ml	5 ml	10 ml

Se realizó Inmunodifusión Radial Simple (SRI) con el fin de cuantificar la concentración en tanto por ciento de proteínas específicas en las fracciones obtenidas de las columnas con relación a la fracción proteínica como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Supl. 10, 41-56, 1983.

La SRI se realizó con los siguientes anticuerpos monoespecíficos:

- 15 - Alfa-1-PI antihumana de conejo, DakoCytomation, Dinamarca, n.º de cat. A0012 (0,6 µl por cm²),
 - Orosomucoide antihumana de conejo, DakoCytomation, Dinamarca, n.º de cat. A0011 (0,8 µl por cm²)

- 20 Se realizó una curva patrón con la fracción proteínica cargada en la columna (no diluida = la referencia del 100%) en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. La concentración relativa de las proteínas específicas en las fracciones recogidas se determinó frente a la curva patrón. El rendimiento relativo de las proteínas específicas en cada fracción se calculó a partir del volumen de la fracción en relación con la cantidad total de la proteína aplicada a la columna.

Resultados

La siguiente tabla muestra el rendimiento relativo de alfa-1-PI y orosomucoide (glicoproteína alfa 1 ácida) en cada fracción en tanto por ciento de la cantidad total aplicada a la columna.

Experimento-1	Ligando: 2-hidroxi-piridina	
	alfa-1-PI	Orosomucoide
Fracción proteínica 1 ejecutada	2%	12%
Fracción proteínica 2 ejecutada	4%	16%
Fracción proteínica 3 ejecutada	6%	16%
Fracción proteínica 4 ejecutada	8%	16%
Fracción proteínica 5 ejecutada	10%	16%
Lavado 1	0%	16%
Lavado 2	N.R.	N.R.
Eluato	80%	0%

Experimento-2	Ligando: 4-bencil-oxi-fenol	
	alfa-1-PI	Orosomucoide
Fracción proteínica 1 ejecutada	0%	0%
Fracción proteínica 2 ejecutada	0%	0%
Fracción proteínica 3 ejecutada	1%	4%
Fracción proteínica 4 ejecutada	2%	6%
Fracción proteínica 5 ejecutada	4%	8%
Lavado 1	0%	0%
Lavado 2	N.R.	N.R.
Eluato	80%	60%

Experimento-3	(Mimo CS) Ligando: 2,5-dimercapto-1,3,4- tiadiazol	
	alfa-1-PI	Orosomucoide
Fracción proteínica 1 ejecutada	1%	8%
Fracción proteínica 2 ejecutada	2%	12%
Fracción proteínica 3 ejecutada	2%	12%
Fracción proteínica 4 ejecutada	8%	16%
Fracción proteínica 5 ejecutada	10%	16%
Lavado 1	0%	0%
Lavado 2	20%	0%
Eluato	50%	0%
"N.R." = No realizado		

Ejemplo comparativo 10

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

Adsorbente

10 El adsorbente se basó en gránulos de agarosa con partículas de carburo de wolframio incorporadas, la densidad de las partículas del conglomerado era de 2,9 g/ml y el diámetro de partícula estaba en el intervalo de 40-120 μm con un diámetro medio de partículas de 70 μm . El adsorbente se activó y se entrecruzó con epíclorhidrina y se acopló con el ligando p-xililendiamina (la concentración final del ligando era de 25 micromoles por ml de adsorbente sedimentado).

Tratamiento previo de la solución proteínica

El plasma humano en bruto (plasma patrón citratado) se ajustó a pH 6,7 con ácido acético 1 M. La conductividad era de aquí en adelante 11,5 mS/cm².

15 Parámetros del procedimiento

El experimento se realizó en una columna de lecho expandido FastLine[®] 10 ($\phi = 1 \text{ cm}$), número de artículo 7010-0000, UpFront Chromatography A/S.

20 La columna se cargó con adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho sedimentado (H_0) de 25 cm (correspondiente a aprox. 20 ml de adsorbente sedimentado) y se lavó y equilibró a 20-25 °C con tampón de citrato de sodio 20 mM, pH 6,7.

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

En la columna se cargaron 100 ml de solución proteínica (correspondiente a 5 veces los volúmenes de lecho sedimentados).

- 5 Después de la carga de la solución proteínica, el material no unido se retiró por lavado de la columna con citrato de sodio 5 mM, pH 6,7 (etiquetado como Lavado 1). Después del Lavado 1, las proteínas débilmente unidas se retiraron por lavado de la columna con citrato de sodio 5 mM + cloruro de sodio 0,2 M pH 6,7 (etiquetado como Lavado 2). Posteriormente, las proteínas fuertemente unidas se eluyeron con citrato de sodio 5 mM + cloruro de sodio 0,8 M, pH 6,7
- 10 La fracción ejecutada y de Lavado 1 se recogieron de la columna como una sola fracción, mientras que la de Lavado 2 y Eluato se recogieron en fracciones independientes.

A continuación, el plasma en bruto, la fracción combinada ejecutada y de lavado y el eluato se midieron para determinar la actividad de un intervalo de factores específicos de coagulación y de anti-coagulación utilizando el analizador DiaMed CD-X (Cresser, Suiza). La actividad biológica del factor de Von Willebrand (vWF) se evaluó con el ensayo del cofactor de ristocetina (vWFRco). El antígeno del factor de von Willebrand (vWFAg) se cuantificó utilizando un ensayo turbidimétrico. La proteína S, la proteína C y el inhibidor de C1 se midieron con un ensayo funcional.

- 15 Otras proteínas tales como albúmina, IgG, alfa-1-antitripsina, fibrinógeno, transferrina y glicoproteína alfa 1 ácida se determinaron mediante inmunodifusión radial simple.
- 20 Ajustando la actividad o cantidad de cualquier proteína específica aplicada a la columna en la solución proteínica al 100%, se puede determinar el rendimiento relativo en cada fracción. La recuperación total se define como la suma de los rendimientos encontrados en las fracciones ejecutadas, de lavado y de elución.

El eluato se analizó adicionalmente por cromatografía de exclusión por tamaño en un Superdex G200 (Amersham Biosciences). Las fracciones del análisis se analizaron para determinar la actividad del Factor VIII.

25 Resultados

Rendimiento y recuperación total de proteínas seleccionadas con relación al material de partida

	Plasma en bruto (%)	Ejecutada/Lavado 1 (%)	Lavado 2 (%)	Eluato (%)	Recuperación (%)
Factor II	100	<5	<5	40	40-50
Factor V	100	<5	70	< 5	70-75
Factor VII	100	<5	<5	100	~ 100
Factor VIII	100	10	10	45	65
Factor IX	100	<5	10	50	60-65
Factor X	100	<5	<5	100	~ 100
Factor XI	100	40	10	20	70
vWFAg	100	<5	<5	60	60-65
vWFRco	100	<5	<5	55	55-60
Proteína S	100	<5	<5	65	65-70
Proteína C	100	<5	<5	65	65-70
Inhibidor de C1	100	10	60	40	~ 100
Fibrinógeno	100	95	<5	<5	95-100
Albúmina	100	97	1	<1	98
IgG	100	98	1	<1	99
Alfa-1-antitripsina	100	99	<1	<1	99
Glicoproteína alfa 1 ácida	100	99	<1	<1	99

La cromatografía de exclusión por tamaño en un Superdex G200 indicó que el Factor VIII en el eluato estaba complejado con el Factor de von Willebrand (la actividad del Factor VIII apareció próxima al volumen vacío de la columna de exclusión por tamaño, mientras que no se encontró ninguna actividad en la posición correspondiente al Factor VIII no complejado).

5 La repetición del experimento a un caudal aumentado de 500 cm/hora dio esencialmente los mismos resultados.

Ejemplo comparativo 11

Aislamiento del complejo Factor VIII-WWF a partir del plasma mediante adsorción en lecho expandido. Capacidad de unión al adsorbente en función del tamaño de partícula adsorbente.

Adsorbentes

10 Los cuatro adsorbentes empleados en este experimento se basaron todos en gránulos de agarosa con partículas de carburo de wolframio incorporadas, la densidad de las partículas de conglomerado era de 2,9 g/ml mientras que el diámetro de la partícula de volumen medio variaba entre 40 y 200 μm . Los adsorbentes se activaron y entrecruzaron con epíclorhidrina y se acoplaron con el ligando p-xililendiamina (la concentración final del ligando era de 25 micromoles por ml de adsorbente sedimentado). Se ensayaron cuatro diferentes preparaciones adsorbentes con los
15 siguientes diámetros de partículas de volumen medio:

- Diámetro de la partícula de volumen medio: 40 μm
- Diámetro de la partícula de volumen medio: 70 μm
- Diámetro de la partícula de volumen medio: 150 μm
- Diámetro de la partícula de volumen medio: 200 μm

20 Tratamiento previo de la solución proteínica

El plasma humano en bruto (plasma patrón citratado) se ajustó a pH 6,7 con ácido acético 1 M. La conductividad era de aquí en adelante 11,5 mS/cm².

Parámetros del procedimiento

25 El experimento se realizó en una columna de lecho expandido FastLine[®] 10 ($\phi = 1$ cm), número de artículo 7010-0000, UpFront Chromatography A/S.

La columna se cargó con adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho sedimentado (H_0) de 25 cm (correspondiente a aprox. 20 ml de adsorbente sedimentado) y se lavó y equilibró a 20-25 °C con tampón de citrato de sodio 20 mM, pH 6,7.

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

En la columna se cargaron 200 ml de solución proteínica (correspondiente a 10 veces los volúmenes de lecho sedimentados).

35 Después de la carga de la solución proteínica, el material no unido se retiró por lavado de la columna con citrato de sodio 5 mM, pH 6,7 (etiquetado como Lavado 1). Después del Lavado 1, las proteínas débilmente unidas se retiraron por lavado de la columna con citrato de sodio 5 mM + cloruro de sodio 0,2 M pH 6,7 (etiquetado como Lavado 2). Posteriormente, las proteínas fuertemente unidas se eluyeron con citrato de sodio 5 mM + cloruro de sodio 0,8 M, pH 6,7

La fracción ejecutada y de Lavado 1 se recogieron de la columna como una sola fracción, mientras que la de Lavado 2 y Eluato se recogieron en fracciones independientes.

40 El plasma en bruto, la fracción combinada ejecutada y de lavado y el eluato se midieron después para determinar la actividad del Factor VIII utilizando el analizador DiaMed CD-X (Cresser, Suiza).

Fijando la actividad del Factor VIII aplicado a la columna en la solución proteínica al 100%, se determinó el rendimiento relativo en cada fracción. La recuperación total se define como la suma de los rendimientos encontrados en las fracciones ejecutadas, de lavado y de elución.

45

Resultados

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

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

- 5 La capacidad de unión del adsorbente con el Factor VIII aumenta significativamente con una disminución en el diámetro de la partícula de volumen medio. El experimento ilustra el superior rendimiento de adsorbentes que tienen un diámetro de la partícula de volumen medio inferior a 150 μm .

Ejemplo comparativo 12

Aislamiento de proteínas del plasma humano a partir de plasma humano utilizando adsorbentes acoplados con diferentes ligandos aromáticos o heteroaromáticos que comprenden grupos ácidos.

Adsorbentes

- 10 Todos los adsorbentes se basaron en agarosa con partículas de carburo de wolframio incorporadas, la densidad de las partículas del conglomerado era de 2,9 g/ml y el diámetro de partícula estaba en el intervalo de 40-120 μm con un diámetro de la partícula de volumen medio de 70 μm . Los adsorbentes se entrecruzaron y activaron con epíclorhidrina y se acoplaron con los siguientes diferentes ligandos: ácido 2-mercaptónico, ácido 2-mercapto-benzoico, ácido 3,4-diamino-benzoico, ácido 2,4-dihidroxibenzoico, ácido 3,5-dihidroxi-benzoico, ácido 2-(4-aminofenil) acético, ácido 2-mercapto-bencimidazol sulfónico, N-benzoil-cisteína.

- 15 La concentración de ligando en todos los adsorbentes individuales se determinó mediante valoración ácido-base que estaba en el intervalo de 25-40 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

Para cada adsorbente se realizó el siguiente experimento :

Tratamiento previo de la solución proteínica

- 20 La solución proteínica, plasma humano, se diluyó con agua desmineralizada en una proporción de un volumen de plasma frente a 2 volúmenes de agua y el pH se ajustó a pH 5,0 con ácido hidrocórico 1 M. La conductividad era a continuación 5,25 mS/cm².

Parámetros del procedimiento:

- 25 El experimento se realizó en una columna de lecho expandido FastLine[®] 10 ($\phi = 1 \text{ cm}$), número de artículo 7010-0000, UpFront Chromatography A/S.

La columna se cargó con adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho sedimentado (H_0) de 50 cm (correspondiente a aprox. 40 ml de adsorbente sedimentado) y se lavó y equilibró a 20-25 °C con los siguientes tampones en orden sucesivo ¹⁾ NaOH 1 M, ²⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 4,5 ³⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 5,0.

- 30 El experimento se realizó con un caudal lineal de 600 cm/h en todas las etapas y la salida de la columna se conectó a un monitor y registrador de UV.

Muestra:

En la columna se cargaron 30 ml de muestra (que corresponden a 10 ml de plasma sin diluir).

Recogida de Fracciones:

- 35 Después de la carga de la solución proteínica, el material no unido y el débilmente unido se retiraron por lavado de la columna con citrato de sodio 10 mM de pH 5,0. La fracción ejecutada y de lavado, RT (fracción no unida), se recogió como una sola fracción según la monitorización UV del efluente de la columna.

Posteriormente, las proteínas unidas se eluyeron en tres etapas secuenciales.

- Eluato 1 - la primera etapa de elución se realizó con caprilato de sodio 5 mg/ml, pH 6,0

ES 2 606 078 T3

- Eluato 2 - la segunda etapa de elución se realizó con citrato de sodio 0,3 M pH 7,4.
- Eluato 3 - la tercera etapa de elución se realizó con citrato de sodio 20 mM + cloruro de sodio 0,1 M pH 7,4

Entre la primera y la segunda etapas de elución la columna se lavó con 1 volumen de columna de citrato de sodio 1 M pH 7,4.

- 5 Cuantificación de proteínas del plasma humano en la fracción Ejecutada/de lavado y en las eluciones 1, 2 y 3: se realizó Inmunodifusión Radial Simple (SRI) para mostrar los componentes en cada fracción de la columna como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Supl. 10, 41-56, 1983.

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

Anticuerpo	Código n.º	µl muestra/pocillo	µl por cm ²
Albúmina antihumana de conejo	A 0001	5 µl	0,30 µl por cm ²
IgG antihumana de conejo	A 0424	5 µl	0,30 µl por cm ²
Alfa-1-PI antihumana de conejo	A 0012	5 µl	0,60 µl por cm ²
Fibrinógeno antihumano de conejo	A 0080	5 µl	0,40 µl por cm ²
Orosomucoide antihumana de conejo	A 0011	5 µl	0,80 µl por cm ²

Transferrina antihumana de conejo	A 0061	5 µl	0,30 µl por cm ²
-----------------------------------	--------	------	-----------------------------

- 10 Se estableció una curva patrón con la solución proteínica (la de 100% de referencia) cargada en la columna en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. Cada una de las cuatro fracciones se determinó en relación con esta curva patrón y se determinó el rendimiento relativo de la proteína específica en cada fracción. Si el rendimiento de una proteína específica en una fracción específica en relación con la cantidad de proteína añadida a la columna es superior al 5%, se define que la proteína se distribuye en dicha fracción.

15 Resultados

Distribución de proteínas seleccionadas en función de la estructura del ligando

Ligando	Inhibidor de la proteinasa alfa 1	Glicoproteína alfa 1 ácida	Albúmina	IgG	Transferrina	Fibrinógeno
Ácido 2-mercapto-nicotínico	RT	RT	E1	E2	E2	E3

Ligando	Inhibidor de la proteinasa alfa 1	Glicoproteína alfa 1 ácida	Albúmina	IgG	Transferrina	Fibrinógeno
Ácido 2-mercapto-benzoico	RT	RT	E1	E2	E2	E3
Ácido 3,4-diamino-benzoico	RT	RT	RT	E1/E2	E1/E2	E2/E3
Ácido 2,4-dihidroxi-benzoico	RT	RT	RT	E2	RT	E2/E3
Ácido 3,5-dihidroxi-benzoico	RT	RT	RT	E2	RT	E2/E3
Ácido 2-(4-amino-feniltio)-acético	RT	RT	RT/E1	E2	E2	E2/E3
Ácido 2-mercapto-benzimidazol sulfónico	RT	RT	RT/E1	E2	E2	E2/E3
N-benzoil-cisteína	RT	RT	E1/E2	E2	E2	E2/E3

RT= ejecutada y primer lavado,
 E1= Eluato 1,
 E2= Eluato 2,
 E3= Eluato 3

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

La tabla ilustra que para el ligando ácido 2-mercapto-nicotínico, el inhibidor de la proteinasa alfa 1 y la glicoproteína alfa 1 ácida están presentes sólo en un grado de más del 5% del total en la fracción ejecutada y en la de lavado, mientras que la Albúmina sólo está presente en el primer eluato, E1, es decir, no hay una cantidad significativa de albúmina presente en ninguna de las otras fracciones, la IgG y la transferrina sólo están presentes en el segundo eluato y el fibrinógeno sólo está presente en el tercer eluato. Por ello, en general se puede señalar que hay muy poca contaminación cruzada de las proteínas individuales entre las fracciones proteínicas individuales obtenidas en el experimento. El experimento ilustra además que puede utilizarse una amplia gama de ligandos aromáticos o heteroaromáticos que comprendan un grupo ácido para el fraccionamiento según la invención de proteínas de plasma o suero humano.

Ejemplo comparativo 13

Aislamiento del inhibidor de la proteinasa alfa 1 humana (alfa-1-PI) de la fracción no unida del ejemplo comparativo 5 de baja fuerza iónica utilizando adsorbente con un ligando diamino-nonano.

Adsorbente

El adsorbente se basó en agarosa al 4% con partículas de carburo de wolframio incorporadas. Los gránulos de conglomerado tenían una densidad de aproximadamente 3,8 g/ml y un tamaño de partícula en el intervalo de 40-100 μm con un tamaño de la partícula de volumen medio de 60 μm . El adsorbente se entrecruzó y se activó con epíclorhidrina y se acopló con diamino-nonano. La concentración de ligando era de aprox. 25 mmoles por ml de adsorbente sedimentado.

Solución proteínica

El material de partida para este experimento fue la Fracción proteínica 1 (el material no unido) obtenida del aislamiento de proteínas de plasma humano utilizando adsorción en lecho expandido como se describe en el ejemplo comparativo 5. El pH en la fracción proteínica se ajustó cuidadosamente a pH 8,2 con hidróxido de sodio 1 M y la conductividad se ajustó a 3,0 mS/cm² con la adición de agua desmineralizada.

Parámetros del procedimiento

El experimento se realizó como una adsorción en lecho expandido.

El experimento se realizó en una columna de lecho expandido FastLine[®] 10 ($\phi = 1 \text{ cm}$), número de artículo 7010-0000, UpFront Chromatography A/S.

La columna se cargó con adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho sedimentado (H_0) de 20 cm (correspondiente a aprox. 16 ml de adsorbente) y se lavó y equilibró a 20-25 °C con los siguientes tampones en orden sucesivo ¹⁾ NaOH 1 M, ²⁾ HCl 0,2 M ³⁾ etanol al 50% en agua ⁴⁾ Tris/HCl 10 mM pH 8,2.

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

Muestra

En la columna se cargaron 700 ml de la fracción proteínica ajustada a pH 8,2 y con una conductividad de 3,0 mS/cm y las fracciones ejecutadas (material no unido). Después de la carga de la fracción proteínica, la columna se lavó con Tris 10 mM/HCl, pH 8,2. La fracción ejecutada y la de lavado se recogieron como una fracción combinada (utilizando el monitor UV para seguir la retirada por lavado del material no unido). Después de la carga y el lavado, la alfa-1-PI unida se liberó y eluyó con citrato sodopotásico 15 mM pH 6,0 y se recogió como Eluato 1. Cuando todo el alfa-1-PI se eluyó, según se monitorizó en el monitor UV, un segundo tampón de elución, citrato de sodio 15 mM + cloruro de sodio 500 mM de pH 5,2 se aplicó entonces para liberar glicoproteína alfa 1 ácida como Eluato 2. El Eluato 2 se recogió según el pico obtenido en el registrador de UV.

Cuantificación del alfa-1-PI humano de la columna

Se realizó una Inmunodifusión Radial Simple (SRI) para cuantificar la concentración relativa de alfa-1-PI y de la glicoproteína alfa 1 ácida (orosomucoide) en las fracciones de la columna como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Supl. 10, 41-56, 1983.

La SRI se realizó con API anti-humana de conejo, n.º de cat.: A0012 (0,6 μl por cm^2) y Orosomucoide anti humana de conejo, n.º de cat. A 00110 (0,8 μl por cm^2) de DakoCytomation, Dinamarca.

Se realizó una curva patrón para cada una de las dos proteínas aplicadas con la fracción proteínica como la referencia 100% cargada en la columna en concentraciones del 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. La concentración de alfa-1-PI y de la glicoproteína alfa 1 ácida se determinó en cada una de las fracciones frente a la curva patrón y se

calculó el rendimiento relativo en esa fracción a partir del volumen de la fracción en relación con el volumen y la concentración de alfa-1-PI en la fracción proteínica aplicada.

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

SDS-PAGE

5 Para la SDS-PAGE, se utilizó gel de Tris-Glicina 4-20% Invitrogen SDS-Page (n.º de cat. EC6025).

Unión a la elastasa

La demostración de la actividad de unión a la elastasa del alfa-1-PI en la fracción proteínica se realizó analizando la materia prima con SDS-PAGE antes y después de la incubación con elastasa (código n.º E0127 de Sigma): La fracción proteínica se ajustó a pH 7 con NaOH 0,2 M y a 500 µl de la fracción proteínica se añadieron 6,5 µl de elastasa de 2,5 mg/ml y se incubaron durante 30 min a 30 °C. Preparación de la muestra: 25 µl de muestra y 25 µl de tampón muestra de Tris-glicina Invitrogen (n.º de cat. LC2676) se mezclaron y se sometieron a ebullición durante 5 minutos en un baño de agua. Se añadió el tampón de migración 0,024 M tris (Sigma T1378), 0,19 M glicina (Merck 5001901000), SDS al 0,1% (dodecilsulfato de sodio, JT Baker 2811) pH 8,6. Se aplicó una muestra de 20 µl en cada franja de análisis y se ajustó la corriente para dar una intensidad de 40 mA. Cuando la línea azul del tampón muestra alcanzó un cm desde el fondo del gel, se cortó la corriente y el gel se tiñó durante la noche en un kit de tinción de azul coloidal Invitrogen (n.º de cat. LC 6025) en una mesa de agitación. Al día siguiente, el gel se transfirió al agua y se destiñó en agua durante 2 horas.

Resultados

20 La siguiente tabla muestra el rendimiento relativo del alfa-1-PI y de la glicoproteína alfa 1 ácida en tanto por ciento de la cantidad total de las proteínas individuales cargadas en la columna:

Fracción	Alfa-1-PI (%)	Glicoproteína alfa 1 ácida (%)
Ejecutada/de Lavado	0	0
Eluato 1	85	< 5
Eluato 2	15	85

Los resultados indican que el procedimiento de adsorción había separado muy eficientemente el alfa-1-PI (inhibidor de la proteinasa alfa 1) y la glicoproteína alfa-1 ácida.

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

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

Ejemplo comparativo 14

30 Aislamiento de proteínas del plasma humano a partir de plasma humano a diferentes pH utilizando un adsorbente acoplado con ácido 2-mercaptocotínico.

Adsorbente

35 El adsorbente se basó en agarosa con partículas de carburo de wolframio incorporadas, la densidad de las partículas de conglomerado era de 3,6 g/ml y el diámetro de partícula estaba en el intervalo de 40-100 µm con un diámetro de la partícula de volumen medio de 50 µm. El adsorbente se entrecruzó y se activó con epíclorhidrina y se acopló con ácido 2-mercaptocotínico para obtener una concentración de ligando de 32 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

Tratamiento previo de la solución proteínica

40 La solución proteínica, plasma humano, se diluyó con agua desmineralizada en una proporción de un volumen de plasma frente a 2 volúmenes de agua. Se realizaron una serie de experimentos en los que el material de partida se ajustó a un intervalo de diferentes valores de pH (utilizando ácido hidroclicórico 1 M en la titulación). Se realizaron los siguientes experimentos:

A. pH de la solución proteínica = 3,0

B. pH de la solución proteínica = 4,0

C. pH de la solución proteínica = 4,5

D. pH de la solución proteínica = 5,0

E. pH de la solución proteínica = 5,5

5 F. pH de la solución proteínica = 6,0

G. pH de la solución proteínica = 6.5

Parámetros del procedimiento

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

10 Para cada experimento, la columna se cargó con adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho (H_0) de 50 cm (que corresponden a aprox. 40 ml de adsorbente sedimentado) y se lavó y equilibró a 20-25 °C con los siguientes tampones en orden sucesivo ¹⁾ NaOH 1 M, ²⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 4,5 ³⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM que tiene el mismo pH que la solución proteínica para el experimento específico.

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

Muestra

En la columna se cargaron 30 ml de solución proteínica (que corresponden a 10 ml de plasma sin diluir).

Recogida de Fracciones:

20 Después de la carga de la solución proteínica, el material no unido y el débilmente unido se retiró por lavado de la columna con citrato de sodio 10 mM que tiene el mismo pH que la muestra para ese experimento particular. La fracción ejecutada y de lavado, RT (fracción no unida), se recogió como una sola fracción según la monitorización UV del efluente de la columna.

Posteriormente, las proteínas unidas se eluyeron en tres etapas secuenciales.

- Eluato 1 - la primera etapa de elución se realizó con caprilato de sodio 5 mg/ml, pH 6,0
- 25 - Eluato 2 - la segunda etapa de elución se realizó con citrato de sodio 0,3 M pH 7,4.
- Eluato 3 - la tercera etapa de elución se realizó con citrato de sodio 20 mM + cloruro de sodio 0,1 M pH 7,4

Entre la primera y la segunda etapas de elución la columna se lavó con 1 volumen de columna de citrato de sodio 1 M pH 7,4.

30 Cuantificación de proteínas del plasma humano en la fracción ejecutada/de lavado y en las eluciones 1, 2 y 3: se realizó Inmunodifusión Radial Simple (SRI) para mostrar los componentes en cada fracción de la columna como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Supl. 10, 41-56, 1983.

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

Anticuerpo	Código n.º	μ l muestra/pocillo	μ l por cm^2
Albúmina antihumana de conejo	A 0001	5 μ l	0,30 μ l por cm^2
IgG antihumana de conejo	A 0424	5 μ l	0,30 μ l por cm^2
Alfa-1-PI antihumano de conejo	A 0012	5 μ l	0,60 μ l por cm^2
Fibrinógeno antihumano de conejo	A 0080	5 μ l	0,40 μ l por cm^2
Orosomucoide antihumana de conejo	A 0011	5 μ l	0,80 μ l por cm^2
Transferrina antihumana de conejo	A 0061	5 μ l	0,30 μ l por cm^2

35 Se estableció una curva patrón con la solución proteínica (la 100% de referencia) cargada en la columna en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. Cada una de las cuatro fracciones se determinó en relación con esta curva patrón y se determinó el rendimiento relativo de la proteína específica en cada fracción. Si el rendimiento de una proteína específica en una fracción proteínica específica en relación con la cantidad de

proteína añadida a la columna es superior al 5%, se define que la proteína se distribuye en dicha fracción.

Resultados

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

pH de la muestra y del tampón de lavado	Inhibidor de proteinasa alfa 1	Glicoproteína alfa 1 ácida	Albúmina	IgG	Transferrina	Fibrinógeno
A. pH = 3,0	RT/E2	ND	RT/E1/E2	RT/E2	RT/E2	RT
B. pH = 4,0	RT/E2	ND	E1/E2	RT/E1 E2/E3	E2	RT/E2/E3
C. pH = 4,5	RT/E2	RT	E1/E2	E2	E2	E3
D. pH = 5,0	RT	RT	E1	E2	E2	E3
E. pH = 5,5	RT	RT	RT/E1	E2	E2	E3
F. pH = 6,9	RT	RT	RT	RT/E2	RT/E2	E3
G. pH = 6,5	RT	RT	RT	RT/E2	RT/E2	RT/E3

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

5 La tabla ilustra que para el ligando ácido 2-mercaptocotínico, un valor de pH de la solución proteínica y del tampón de lavado en el intervalo de pH 5,0 a pH 5,5 da como resultado la separación más eficaz de las proteínas analizadas. Más proteínas aparecen en la fracción no unida, RT, siempre que el pH sea inferior a pH 4,5 o superior a pH 5,5. Por debajo del pH 5,0, se encuentra que la alfa-1-antitripsina (inhibidor de la proteinasa alfa 1) se desnaturaliza (polimeriza), lo que se apoya en el hallazgo de que aparece tanto en RT como en E2 a pH 4,5 e inferior.

10 Ejemplo comparativo 15

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

Adsorbente

15 El adsorbente se basó en agarosa con partículas de carburo de wolframio incorporadas, la densidad de las partículas del conglomerado era de 3,6 g/ml y el diámetro de partícula estaba en el intervalo de 40-100 µm con un diámetro de la partícula de volumen medio de 50 µm. El adsorbente se entrecruzó y se activó con epíclorhidrina y se acopló con ácido 2-mercaptocotínico para obtener una concentración de ligando de 32 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

Tratamiento previo de la solución proteínica

20 La solución proteínica, plasma humano, se diluyó con agua desmineralizada en una proporción de un volumen de plasma frente a 2 volúmenes de agua. Se realizaron una serie de experimentos en donde a la solución proteínica se añadió una gama de diferentes sustancias tampón dando como resultado una gama de diferentes fuerzas iónicas/conductividades. Todos los experimentos se realizaron a un pH de la muestra de 5,0.

Se realizaron los siguientes experimentos:

- 25 A. Citrato de sodio 10 mM, conductividad = 6,0 mS/cm
- B. Citrato de sodio 20 mM, conductividad = 8,5 mS/cm
- C. Acetato de sodio 20 mM, conductividad = 6,2 mS/cm
- D. Histidina 20 mM, conductividad = 6,6 mS/cm
- E. Glicina 20 mM, conductividad = 5,5 mS/cm
- 30 F. Octilamina 20 mM, conductividad = 8,0 mS/cm

Parámetros del procedimiento:

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

- 5 Para cada experimento, la columna se cargó con adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho (H_0) de 50 cm (que corresponden a aprox. 40 ml de adsorbente sedimentado) y se lavó y equilibró a 20-25 °C con los siguientes tampones en orden sucesivo ¹⁾ NaOH 1 M, ²⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 4,5 ³⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 5,0.

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

Muestra

- 10 En la columna se cargaron 30 ml de solución proteínica (que corresponden a 10 ml de plasma sin diluir).

Recogida de fracciones proteínicas:

- 15 Después de la carga de la solución proteínica, el material no unido y el débilmente unido se retiraron por lavado de la columna con el mismo tipo de tampón y la misma concentración de tampón que se añadió a la muestra para el experimento particular. Todos los tampones de lavado estaban a pH 5,0. La fracción ejecutada y la de lavado, RT (fracción no unida), se recogió como una sola fracción según la monitorización UV del efluente de la columna.

Posteriormente, las proteínas unidas se eluyeron en tres etapas secuenciales.

- Eluato 1 - la primera etapa de elución se realizó con caprilato de sodio 5 mg/ml, pH 6,0
- Eluato 2 - la segunda etapa de elución se realizó con citrato de sodio 0,3 M pH 7,4.
- Eluato 3 - la tercera etapa de elución se realizó con citrato de sodio 20 mM + cloruro de sodio 0,1 M pH 7,4

- 20 Entre la primera y la segunda etapas de elución la columna se lavó con 1 volumen de columna de citrato de sodio 1 M pH 7,4.

Cuantificación de proteínas del plasma humano en la fracción ejecutada/de lavado y en las eluciones 1, 2 y 3: se realizó Inmunodifusión Radial Simple (SRI) para mostrar los componentes en cada fracción de la columna como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Supl. 10, 41-56, 1983.

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

Anticuerpo	Código n.º	μ l muestra/pocillo	μ l por cm^2
Albúmina antihumana de conejo	A 0001	5 μ l	0,30 μ l por cm^2
IgG antihumana de conejo	A 0424	5 μ l	0,30 μ l por cm^2
Alfa-1-PI antihumano de conejo	A 0012	5 μ l	0,60 μ l por cm^2
Fibrinógeno antihumano de conejo	A 0080	5 μ l	0,40 μ l por cm^2
Orosomucoide antihumana de conejo	A 0011	5 μ l	0,80 μ l por cm^2
Transferrina antihumana de conejo	A 0061	5 μ l	0,30 μ l por cm^2

- 30 Se estableció una curva patrón con la solución proteínica (la de 100% de referencia) cargada en la columna en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. Cada una de las cuatro fracciones se determinó en relación con esta curva patrón y en cada fracción se determinó el rendimiento relativo de la proteína específica. Si el rendimiento de una proteína específica en una fracción proteínica específica en relación con la cantidad de proteína añadida a la columna es superior al 5%, se define que la proteína se distribuye en dicha fracción.

Resultados

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

Tampón añadido a muestra y tampón de lavado	Inhibidor de la proteinasa alfa 1	Glicoproteína alfa 1 ácida	Albúmina	IgG	Transferrina	Fibrinógeno
A. Citrato de sodio 10 mM	RT	RT	E1	E2	E2	E3

Tampón añadido a muestra y tampón de lavado	Inhibidor de la proteínasa alfa 1	Glicoproteína alfa 1 ácida	Albúmina	IgG	Transferrina	Fibrinógeno
B. Citrato de sodio 20 mM	RT	RT	RT/E1	E2	E2	E3
C. Acetato de sodio 20 mM	RT	RT	E1	E2	E2	E3
D. Histidina 20 mM	RT	RT	E1	E2	E2	E3
E. Glicina 20 mM	RT	RT	E1	E2	E2	E3
F. Octilamina 20 mM	RT	RT	RT	RT	RT	RT/E3
RT= ejecutada y primer lavado, E1=Eluato 1, E2=Eluato 2, E3=Eluato 3. Umbral: al menos 5% de la proteína específica aplicada a la columna debe estar presente en la fracción.						

Ejemplo comparativo 16

Aislamiento de proteínas del plasma humano y animal a partir de diferentes plasmas humano y animal no diluidos utilizando un adsorbente acoplado con ácido 2-mercaptónico.

Adsorbente

- 5 El adsorbente se basó en agarosa con partículas de carburo de wolframio incorporadas, la densidad de las partículas de conglomerado era de 2,0 g/ml y el diámetro de partícula estaba en el intervalo de 50-150 μm con un diámetro de la partícula de volumen medio de 120 μm . El adsorbente se entrecruzó y se activó con epíclorhidrina y se acopló con ácido 2-mercaptónico para obtener una concentración de ligando de 36 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

10 Tratamiento previo de la solución proteínica

La solución proteínica, plasma humano y una gama de plasmas de diferentes animales, se ajustó a pH 5,0 con ácido hidrocórico 1 M. Una serie de experimentos se realizaron utilizando diferentes plasmas.

Se realizaron los siguientes experimentos:

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

Parámetros del procedimiento

Los experimentos se realizaron en una columna de lecho expandido FastLine® 10 ($\phi = 1 \text{ cm}$), número de artículo 7010-0000, UpFront Chromatography A/S.

- 25 Para cada experimento, la columna se cargó con adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho (H_0) de 50 cm (que corresponden a aprox. 40 ml de adsorbente sedimentado) y se lavó y equilibró a 20-25 °C con los siguientes tampones en orden sucesivo ¹⁾ NaOH 1 M, ²⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 4,5 ³⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 5,0.

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

Muestra

En la columna se cargaron 20 ml de solución proteínica (que corresponden a 0,5 ml de plasma por ml de adsorbente

sedimentado).

Recogida de fracciones proteínicas:

5 Después de la carga de la solución proteínica, el material no unido y el ligeramente unido se retiraron por lavado de la columna de citrato de sodio 10 mM pH 5,0. La fracción ejecutada y de lavado, RT (fracción proteínica no unida) se recogió como una sola fracción proteínica según la monitorización UV del efluente de la columna.

Posteriormente, las proteínas unidas se eluyeron en dos etapas secuenciales.

- Eluato 1 - la primera etapa de elución se realizó con caprilato de sodio 5 mg/ml, pH 6,0
- Eluato 2 - la segunda etapa de elución se realizó con citrato de sodio 20 mM + cloruro de sodio 0,1 M pH 7,4

10 Todas las fracciones proteínicas se analizaron mediante SDS-PAGE NO REDUCIDA utilizando gel de 4-20% Tris-Glicina Invitrogen SDS-Page (n.º de cat. EC6025). Las bandas teñidas con Coomassie en la SDS PAGE se examinaron cualitativa y semicuantitativamente mediante inspección visual para registrar la distribución de proteínas de plasma seleccionadas en las fracciones de columnas individuales. Si se estima que una banda proteínica, presente en una fracción proteínica específica, representa más del 10% de la proteína total añadida a la columna, se define que la proteína se distribuye en esa fracción proteínica particular (el valor umbral).

15 Resultados

Distribución de proteínas seleccionadas en función del origen de la muestra.

Muestra	Albúmina	IgG
A. Plasma humano	RT/E1	E2
B. Plasma de caballo	RT/E1	E2
C. Plasma de vaca	RT/E1	E2
D. Plasma de conejo	RT/E1	E2
E. Plasma de cabra	RT/E1	E2
F. Plasma de pollo	RT/E1	E2
G. Plasma de cerdo	RT/E1	E2
H. Plasma de ratón	RT/E1	E2

RT= ejecutada y primer lavado, E1=Eluato 1, E2=Eluato 2. Umbral: al menos 10% de la proteína específica aplicada a la columna está presente en la fracción.

20 Los resultados ilustran que diferentes plasmas animal y humano sin diluir se comportan de forma muy similar cuando se fraccionan con un adsorbente acoplado con ácido 2-mercapto-nicotínico en las condiciones de procedimiento especificadas. El adsorbente se une y se eluye prácticamente con todas las IgG de todas las especies ensayadas. El adsorbente se une a la mayor parte de la albúmina presente en todas las muestras de plasma ensayadas y en todos los experimentos la albúmina unida se eluye eficazmente mediante el tampón de pH 6,0 de caprilato de sodio de 5 mg/ml.

Ejemplo comparativo 17

25 Aislamiento de proteínas del plasma humano a partir de plasma humano utilizando adsorbentes de diferentes tamaños acoplados con ácido 2-mercaptónico.

Adsorbente

Todos los adsorbentes empleados se basaron en agarosa con partículas de carburo de wolframio incorporadas, la densidad de las partículas del conglomerado era de 2,5 g/ml y el diámetro de partícula y el diámetro de la partícula de volumen medio variaban de la forma siguiente:

30 Adsorbente A. Intervalo del diámetro de partícula: 60-140 µm; Diámetro de la partícula de volumen medio: 90 µm

Adsorbente B. Intervalo del diámetro de partícula: 60-150 µm; Diámetro de la partícula de volumen medio 120 µm

Adsorbente C. Intervalo del diámetro de partícula: 80-240 µm; Diámetro de la partícula de volumen medio 150 µm

Adsorbente D. Intervalo del diámetro de partícula: 80-300 µm; Diámetro de la partícula de volumen medio 200 µm

Adsorbente E. Intervalo del diámetro de partícula: 100-400 μm ; Diámetro de la partícula de volumen medio: 250 μm

5 Los adsorbentes A-E se produjeron tamizando con redes de nailon de tamaño de poro definido a partir de un lote de partículas que tienen una amplia distribución de tamaños, que primero se entrecruzaron y activaron con epíclorhidrina y se acoplaron con ácido 2-mercaptónico nicotínico para obtener una concentración de ligando de 28 micromoles por ml de adsorbente sedimentado. Con ello, todos los adsorbentes A-E se diseñaron para desviarse entre sí solo con respecto al tamaño de las partículas.

Para cada uno de los adsorbentes A-E se realizó el siguiente experimento:

Tratamiento previo de la solución proteínica

10 La solución proteínica, plasma humano, se diluyó con agua desmineralizada en una proporción de un volumen de plasma frente a 2 volúmenes de agua y el pH se ajustó a pH 5,0 con ácido hidroclicórico 1 M. La conductividad era de aquí en adelante 5,2 mS/cm².

Parámetros del procedimiento

El experimento se realizó en una columna de lecho expandido FastLine[®] 10 ($\phi = 1 \text{ cm}$), número de artículo 7010-0000, UpFront Chromatography A/S.

15 La columna se cargó con adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho (H_0) de 50 cm (que corresponden a aprox. 40 ml de adsorbente sedimentado) y se lavó y equilibró a 20-25 °C con los siguientes tampones en orden sucesivo ¹⁾ NaOH 1 M, ²⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 4,5 ³⁾ tampón de ácido cítrico 40 mM pH 5,0.

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

20 Muestra

En la columna se cargaron 30 ml de muestra (que corresponden a 10 ml de plasma sin diluir).

Recogida de fracciones proteínicas:

25 Después de la carga de la muestra de proteína, el material no unido y el débilmente unido se retiraron por lavado de la columna con 10 mM de citrato de sodio pH 5,0. La fracción ejecutada y de lavado, RT (fracción no unida), se recogió como una sola fracción proteínica según la monitorización UV del efluente de la columna.

Posteriormente, las proteínas unidas se eluyeron en dos etapas secuenciales.

- Eluato 1 - la primera etapa de elución se realizó con caprilato de sodio 5 mg/ml, pH 6,0
- Eluato 2 - la segunda etapa de elución se realizó con citrato de sodio 20 mM + cloruro de sodio 0,1 M pH 7,4

30 Cuantificación de proteínas de plasma humano en la fracción ejecutada/de lavado y las eluciones 1 y 2, se realizó Inmunodifusión Radial Simple (SRI) para mostrar los componentes en cada fracción proteínica de la columna como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Supl. 10, 41-56, 1983.

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

Anticuerpo	Código n.º	μl muestra/pocillo	μl por cm^2
Albúmina antihumana de conejo	A 0001	5 ml	0,30 μl por cm^2
IgG antihumana de conejo	A 0424	5 ml	0,30 μl por cm^2

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

Resultados:

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

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

- 5 Los resultados ilustran que a un caudal elevado (900 cm/hora) sólo los adsorbentes que tienen un tamaño de la partícula de volumen medio inferior a 150 μm consiguen unir prácticamente toda la albúmina e IgG presentes en la muestra aplicada. Cuanto mayor sea el tamaño de partícula menor será el rendimiento de las proteínas en las fracciones proteínicas de los eluatos respectivos.

Ejemplo comparativo 18

Aislamiento a gran escala de proteínas del plasma humano a partir de plasma humano en una columna EBA de 30 cm de diámetro.

- 10 Adsorbente

El adsorbente se basó en agarosa con partículas de carburo de wolframio incorporadas, la densidad de las partículas de conglomerado era de 2,8 g/ml y el diámetro de partícula se encuentra en el intervalo de 40-120 μm con un diámetro de partícula medio de 72 μm . El adsorbente comprendía ácido 2-mercaptocotínico como ligando y tenía una concentración de ligando de 38 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

- 15 Tratamiento previo de la solución proteínica

La solución proteínica, plasma humano citratado, se diluyó con agua desmineralizada en una proporción de un volumen de plasma frente a 2 volúmenes de agua y el pH se ajustó a pH 5,0 con ácido hidrocórico 1 M. La conductividad era de aquí en adelante 5,3 mS/cm².

Parámetros del procedimiento

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

- 25 La columna se cargó con adsorbente hasta alcanzar una altura de lecho sedimentado (H_0) de 50 cm (que corresponden a aprox. 35,3 l de adsorbente) y se lavó y equilibró a 20-25 °C con los siguientes tampones en orden sucesivo ¹⁾ 36 l de NaOH 1M, ²⁾ 90 l de tampón de ácido cítrico 40 mM pH 4,5 ³⁾ 90 l de tampón de ácido cítrico 40 mM pH 5,0.

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

Muestra

En la columna se cargó una solución de 39 l de proteína (que corresponde a 13 l de plasma sin diluir).

Recogida de fracciones proteínicas:

5 Después de la carga de la solución proteínica, el material no unido y el débilmente unido se retiraron por lavado de la columna con citrato de sodio 10 mM de pH 5,0. La fracción 1 (fracción no unida) se recogió como una sola fracción proteínica según la monitorización UV del efluente de la columna.

Posteriormente, las proteínas unidas se eluyeron en tres etapas secuenciales.

- Fracción proteínica 2 - la primera etapa de elución se realizó con caprilato de sodio 5 mg/ml, pH 6,0
- Fracción proteínica 3 - la segunda etapa de elución se realizó con citrato de sodio 0,3 M, pH 7,4.
- 10 - Fracción proteínica 4 - la tercera etapa de elución se realizó con citrato de sodio 20 mM + NaCl 0,1 M, pH 7,4

Entre la primera y la segunda etapas de elución, la columna se lavó brevemente con 40 l de citrato de sodio 1 M, pH 7,4.

Resultados

La siguiente tabla muestra los volúmenes de cada fracción:

15 Cuantificación de las proteínas de plasma humano, fracciones 1, 2, 3 y 4 de la columna

Fracción	Serie
Tampón de equilibrio ⁽¹⁾	36 l
Tampón de equilibrio ⁽²⁾	90 l
Tampón de equilibrio ⁽³⁾	90 l
Fracción proteínica 1 Proteínas no unidas y lavado	293 l
Fracción proteínica 2	136 l
Fracción proteínica 3	135 l
Fracción proteínica 4	83 l

Se realizó Inmunodifusión Radial Simple (SRI) con el fin de mostrar los componentes en cada fracción proteínica de la columna como se describe en Scand. J. Immunol. Vol. 17, Supl. 10, 41-56, 1983.

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

Anticuerpo	Código n.º	µl muestra/pocillo	µl por cm ²
Albúmina antihumana de conejo	A 0001	5 µl	0,30 µl por cm ²
IgG antihumana de conejo	A 0424	5 µl	0,30 µl por cm ²
Alfa-1-PI antihumano de conejo	A 0012	5 µl	0,60 µl por cm ²
Fibrinógeno antihumano de conejo	A 0080	5 µl	0,40 µl por cm ²
Haptoglobina antihumana de conejo	A 0030	15 µl	0,45 µl por cm ²
Globulina GC antihumana de conejo	A 0021	15 µl	0,60 µl por cm ²
IgM antihumana de conejo	A 0426	15 µl	0,40 µl por cm ²
IgA antihumana de conejo	A 0092	15 µl	0,50 µl por cm ²
Macroglobulina alfa-2 antihumana de conejo	A 0033	15 µl	0,40 µl por cm ²
Orosomucoide antihumano de conejo	A 0011	5 µl	0,80 µl por cm ²
Transferrina antihumana de conejo	A 0061	5 µl	0,30 µl por cm ²
Prealbúmina antihumana de conejo	A 0002	15 µl	0,75 µl por cm ²

Anticuerpo	Código n.º	µl muestra/pocillo	µl por cm ²
Antitrombina III antihumana de conejo	A 0296	25 µl	0,50 µl por cm ²

Se estableció una curva patrón con la solución proteínica (la de 100% de referencia) cargada en la columna en la concentración de 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. Cada una de las cuatro fracciones proteínicas se determinó en relación con esta curva patrón para cada proteína ensayada y se determinó el rendimiento relativo de la proteína específica en cada fracción proteínica.

5 Resultados

Rendimiento de cada proteína humana en relación con la materia prima aplicada en cada una de las 4 fracciones de la columna EBA:

	Fracción 1 Material no unido	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4
Albúmina humana	-	98%	-	-
IgG humana	-	-	95%	5%
Alfa-1-PI humana	95%	-	-	-
Fibrinógeno humano	-	-	10%	60-80%
Haptoglobina humana	40%	40%	20%	-
Globulina GC humana	-	100%	-	-
IgM humana	-	-	75%	-
IgA humana	15%	20%	70%	-
Macroglobulina alfa-2 humana	-	45%	35%	-
Orosomucoide humana	100%	-	-	-
Transferrina humana	-	-	95%	-
Prealbúmina humana	55%	-	-	-
Antitrombina III humana	-	75%	-	-
"- " = rendimiento relativo inferior al 5%				

El procedimiento según la invención funcionaba eficazmente a gran escala y daba como resultado una separación de las proteínas del plasma muy similar a los experimentos realizados en columnas de 1 cm de diámetro.

10 Ejemplo comparativo 19

Aislamiento de proteínas del plasma humano a partir de plasma Cryo-poor utilizando adsorción en lecho expandido con un caudal a 450 cm/h y condiciones como en el ejemplo comparativo 5.

15 Plasma Cryo-poor, también llamado criosobrenadante, producido por lenta descongelación de plasma humano congelado, citratado, y separación del crioprecipitado, se usó en lugar de solo plasma humano citratado en una repetición del ejemplo comparativo 5. Todos los demás parámetros se mantuvieron constantes.

Resultados

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

20 Ejemplo comparativo 20

Aislamiento del fibrinógeno del Crioprecipitado resolubilizado. Adsorción por lotes utilizando adsorbente de alta densidad que tiene un pequeño diámetro del volumen medio.

Adsorbente

25 El adsorbente se basó en agarosa con partículas de carburo de wolframio incorporadas, la densidad de las partículas de conglomerado era de 3,8 g/ml y el diámetro de partícula estaba en el intervalo de 20-60 µm con un diámetro medio de partícula de 38 µm. El adsorbente comprendía ácido 2-mercaptónico como ligando y una

concentración de ligando de 31 micromoles por ml de adsorbente sedimentado.

Tratamiento previo de la solución proteínica

5 El crioprecipitado producido por descongelación lenta de 2.000 ml de plasma humano citratado congelado y separado del criosobrenadante se volvió a solubilizar mezclando con citrato de sodio 10 mM, pH 6,7, dando como resultado aprox. 120 ml de solución turbia.

Adsorción por lotes seguida por elución en columna

10 El crioprecipitado resolubilizado se transfirió a un vaso de precipitados de vidrio de 200 ml y se añadieron 20 ml de gránulos adsorbentes lavados a fondo con citrato de sodio 10 mM de pH 6,7. La mezcla de adsorbente y solución proteínica se realizó con una agitación mecánica moderada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la adsorción, el adsorbente se dejó sedimentar y el sobrenadante se decantó. A continuación se añadió tampón de lavado (citrato de sodio 20 mM, pH 6,7) en 3 veces alícuotas de 100 ml con mezcla, sedimentación y decantación entre cada adición. La mezcla se realizó durante 2 minutos para cada adición. Después del lavado, el adsorbente se suspendió en una pequeña cantidad de tampón de lavado y se vertió en una columna de lecho empaquetado de 2 cm de diámetro, en la que se sedimentó muy rápidamente. La elución de la proteína unida se realizó entonces
15 añadiendo fosfato de potasio 20 mM + cloruro de sodio 0,8 M, pH 6,7, a un caudal de 2 ml por minuto. La elución de la columna se controló con un monitor de UV y el pico de elución se recogió en una fracción.

La fracción proteínica de eluato se analizó para determinar su pureza utilizando SDS-PAGE (gel de Tris-glicina de 4-20% no reducido Invitrogen SDS-APGE, n.º de cat.: EC6025). La actividad funcional del fibrinógeno se determinó por el procedimiento de von Clauss (tiempo de coagulación con trombina bovina).

20 Resultados

Al detener la mezcla del adsorbente y del crioprecipitado resolubilizado después de los 30 minutos del período de adsorción, las partículas adsorbentes sedimentaron en el fondo del recipiente en menos de 30 segundos. La decantación de los sobrenadantes del adsorbente sedimentado era extremadamente fácil dado que los gránulos adsorbentes permanecieron en el fondo del vaso de precipitados de vidrio sin ninguna tendencia significativa a mezclarse con la fase líquida. La adición y lavado con tampón de lavado 3 veces se realizó igualmente en pocos minutos debido a la rápida separación del adsorbente. El adsorbente se empaquetó igualmente en la columna de elución en menos de un minuto (estos procedimientos duran normalmente varias horas con gránulos de baja densidad de un diámetro tan pequeño). El fibrinógeno se eluyó de la columna en forma de una solución transparente muy concentrada de fibrinógeno (volumen de elución = 21 ml).

30 El análisis por SDS-PAGE del fibrinógeno eluido reveló que la proteína era más del 85% pura, siendo IgG el contaminante principal. No se pudo detectar albúmina en el eluato. Se encontró que la actividad biológica del fibrinógeno eluido estaba completamente intacta.

El experimento ilustra la ventaja significativa de usar un adsorbente de alta densidad que tiene un diámetro pequeño del volumen medio para la separación de proteínas del plasma del crioprecipitado resolubilizado.

35 Ejemplo comparativo 21

Aislamiento en cascada de factores de coagulación/anti-coagulación, Albúmina, IgG, Fibrinógeno, inhibidor de la proteinasa alfa 1 y glicoproteína alfa 1 ácida utilizando tres columnas consecutivas y plasma humano con los virus eliminados como solución proteínica.

Adsorbentes

40 En este experimento se utilizaron los adsorbentes utilizados en el ejemplo comparativo 10 (Ligando = 1,4-diaminóxilileno), en el ejemplo comparativo 5 (ácido 2-mercapto-nicotínico) y en el ejemplo comparativo 13 (1,9-diaminononano).

Eliminación de los virus

45 Una solución proteínica de plasma humano se trató con una solución disolvente-detergente (conocida como tratamiento S/D) mediante la adición de fosfato de tri-n-butilo (concentración final de 0,3%) y Tween-80 (concentración final del 1%) a 25 grados Celsius seguido de incubación a la misma temperatura durante 6 horas.

Adsorción sucesiva

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

Columna A: Como se describe en el ejemplo comparativo 10

50 Columna B: Como se describe en el ejemplo comparativo 5

Columna C: Como se describe en el ejemplo comparativo 13

5 La columna A se realizó como se describe en el ejemplo comparativo 10. La fracción combinada ejecutada y lavada se ajustó a pH 5,0 con ácido hidroclicórico 1 M y después se diluyó con agua para obtener una dilución final en relación con el volumen de material de partida correspondiente a 1+2 (como se describe en el ejemplo comparativo 5) y a continuación se aplicaron 120 ml de la solución proteínica diluida a la columna B como se describe en el ejemplo comparativo 5. La fracción combinada ejecutada y de lavado de la columna B se recogió, se pretrató y se procesó como se describe en el ejemplo comparativo 13. Para las tres columnas, todas las fracciones proteínicas de elución se recogieron y se analizaron como se describe en los respectivos ejemplos comparativos.

Resultados

10 El análisis de los eluatos de todas las columnas dio esencialmente los mismos resultados descritos en los ejemplos comparativos individuales. De ese modo, la etapa de eliminación vírica por tratamiento con S/D no interfirió con el fraccionamiento de las proteínas cuando se usaron los adsorbentes seleccionados. Al mismo tiempo, en ninguna de las fracciones proteínicas aisladas se pudo detectar ni Tween-80 ni fosfato de tri-n-butilo que ilustrara sorprendentemente que ninguno de los adsorbentes elegidos se unen a estas sustancias. Por lo tanto, las fracciones proteínicas aisladas se agotan eficientemente para las sustancias de eliminación vírica simultáneamente con la separación real de las proteínas y, por lo tanto, no se requieren etapas adicionales para eliminarlas de las proteínas aisladas.

20 El experimento ilustra además la eficaz separación consecutiva de proteínas del plasma humano en la siguientes, en total 6, diferentes fracciones proteínicas que tienen muy poca contaminación cruzada y muy alto rendimiento: A. Factores de coagulación y de anti-coagulación, B. Albúmina, C. IgG y transferrina, D. Fibrinógeno, E. Inhibidor de la proteinasa alfa 1 y F. Glicoproteína alfa 1 ácida.

La experimentación adicional con el intercambio del orden de las etapas de adsorción ha demostrado que:

- La columna A debe ser la primera a fin de evitar la inactivación de los factores de coagulación a pH 5,0 (utilizado para la columna B)
- 25 • La columna C debe estar después de la columna B para evitar una unión excesiva de albúmina a la columna C y la consiguiente contaminación grave del inhibidor de la proteinasa alfa 1.

Referencias

Cohn et al, "Separation into Fractions of Protein and Lipoprotein Components" J. Am. Chem. Soc, 68, 459-475, 1946

30 E. J. Cohn et al., Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins, IV, A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids, The Journal of the American Chemical Society, vol. LXVIII (Jan.-Jul. 1946), pp. 459-475

Scand. J. Immunol. Vol. 17, Suppl. 10, 41-56, 1983

Finette G.M.S. et al, Biotechnol. Prog., 1998, 14, pp286-293

35 Malvern Instruments Ltd (Worcestershire, UK) in their Operators guide (MAN 0320 Issue 1.0 Mar. 2004) to the Mastersizer 2000E

US 2.390.074

US 2.469.193

US 6.617.133

US 6.036.861

40 US 4.481.189

EP 0 722 771

WO 01/85329

WO 92/18237

WO 2000/25884

45 WO 02/05923

WO 99/65586

WO 00/57982

WO 99/51316

WO 92/00799

WO 92/16292

5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el aislamiento de una o más proteínas humanas a partir de una solución proteínica en donde la solución proteínica se obtiene a partir de plasma humano y contiene etanol, y una fracción de Cohn se selecciona del grupo que consiste en sobrenadante I, sobrenadante II + III, sobrenadante I + II + III, fracción resolubilizada II + III, fracción resolubilizada IV-1, y una combinación de los mismos, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 5 una fracción de Cohn
- a) ajustar el pH de la solución proteínica a un pH preestablecido;
- b) ajustar la fuerza iónica de la solución proteínica a una fuerza iónica preestablecida;
- 10 c) aplicar dicha solución proteínica a una columna de adsorción de lecho expandido que comprende partículas adsorbentes de alta densidad que tienen una densidad de 1,5 g/ml a 15 g/ml, y en donde el 85% en volumen de las partículas adsorbentes de alta densidad tienen un diámetro de partícula en el intervalo de 10 a 150 μm ;
- d) lavar la columna con un tampón de lavado para retirar por lavado el material no unido;
- e) lavar la columna con un tampón de elución para eluir una o más de las proteínas humanas desde el adsorbente;
- 15 en donde el caudal lineal de líquido a través de la columna es de al menos 2 cm/min.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde el sobrenadante o la fracción precipitada tiene una concentración de alcohol de al menos 5% en volumen.
3. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el adsorbente comprende un polímero matriz funcionalizado que lleva una pluralidad de grupos funcionales unidos de forma covalente que comprenden un sistema de anillo aromático o heteroaromático y uno o más grupos ácidos.
- 20 4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichas una o más de las proteínas de la sangre humana se seleccionan del grupo que consiste en albúmina, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, inhibidor de la proteinasa alfa 1, proteína pro-coagulación de la sangre, proteína anti-coagulación de la sangre, agente trombolítico, proteína antiangiogénica, α -2-antiplasmina, inhibidor de la esterasa C-1, apolipoproteína, HDL, LDL, Fibronectina, beta-2-glicoproteína I, fibrinógeno, plasminógeno, plasmina, activador del plasminógeno, inhibidor del plasminógeno, estreptocinasa, inhibidor de la inter-alfa-tripsina, α -2-macroglobulina, proteína amiloide, ferritina, prealbúmina, GC-globulina, hemopexina, complemento C3, transferrina, urocinasa y α -1-ácido-glicoproteína.
5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde una o más proteínas son retiradas por lavado como una proteína no unida con uno o más tampones de lavado.
- 30 6. Un procedimiento según la reivindicación 5, en donde dicha proteína no unida comprende inhibidor de la proteinasa alfa 1.
7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el pH preestablecido está en el intervalo de pH de 3,0 a pH 10,0, y/o en donde la fuerza iónica preestablecida está en el intervalo de 0,0001 a 12,0.
- 35 8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el adsorbente tiene una capacidad de unión dinámica al 10% de saturación para dicha, al menos una, proteína específica de al menos 5 g por litro de adsorbente sedimentado.
9. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la albúmina y la IgG están unidas al adsorbente y simultáneamente se obtiene el inhibidor de la proteinasa α -1 como material no unido desde el adsorbente
- 40 10. Un procedimiento según la reivindicación 9, en donde la albúmina y la IgG se obtienen desde el adsorbente por elución escalonada.

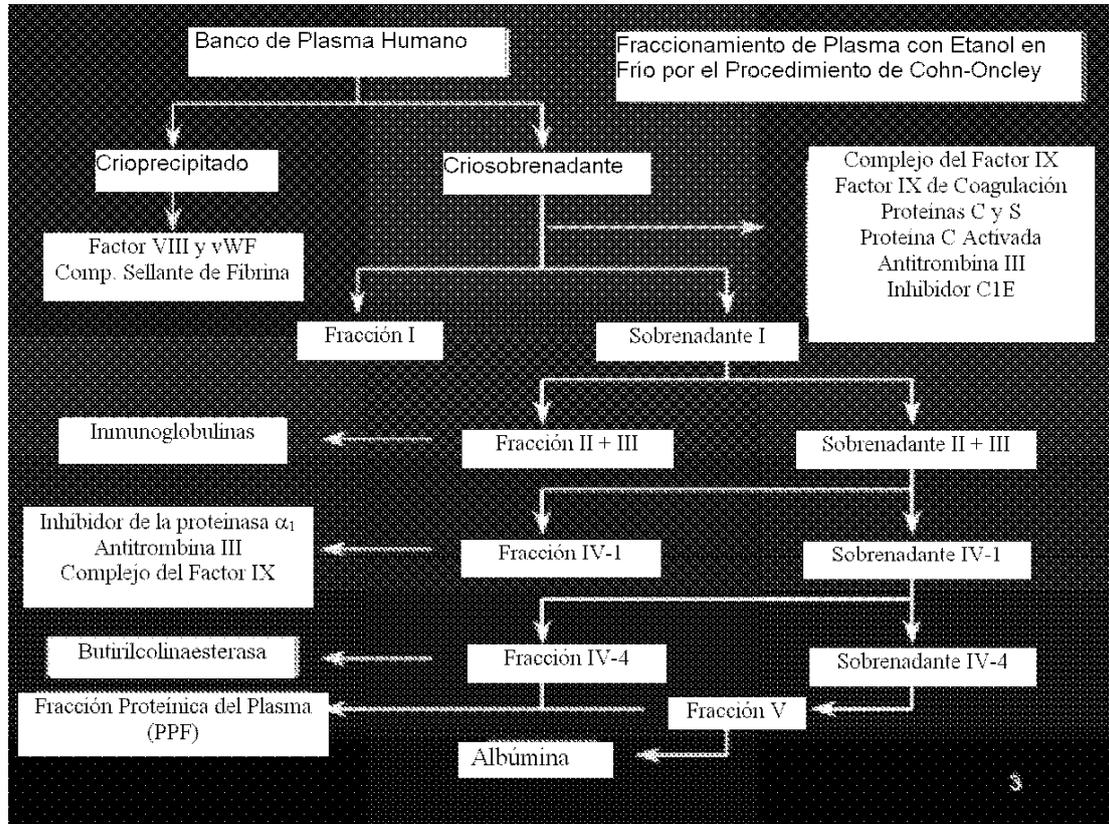


Fig. 1

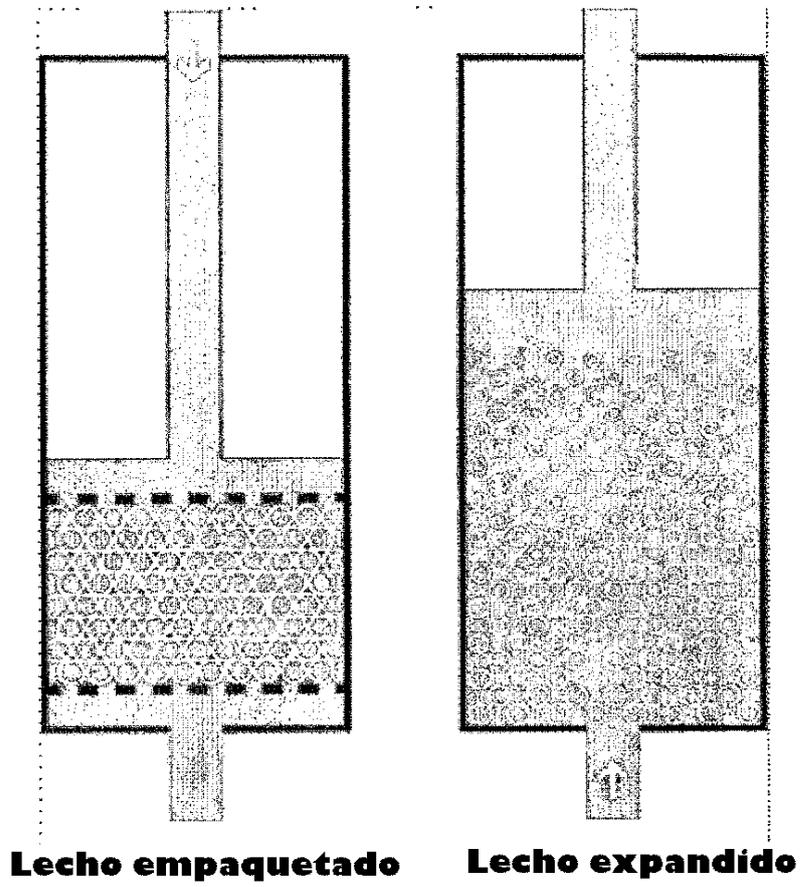


Fig. 2

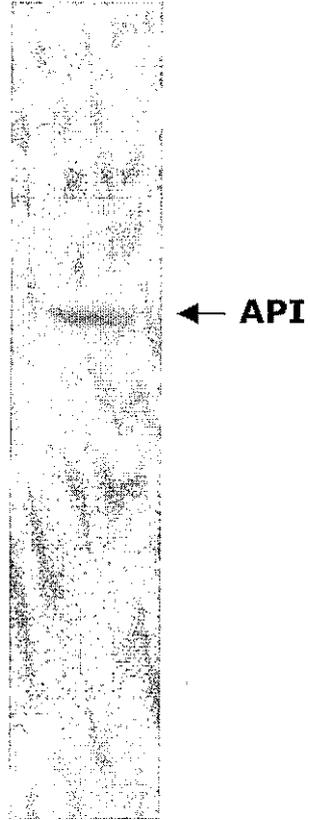


Fig. 3

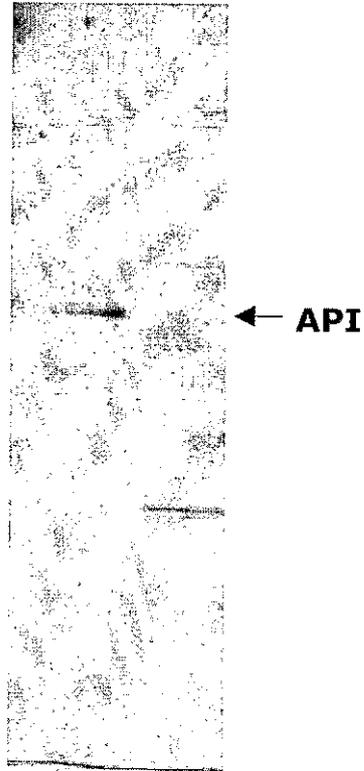


Fig. 4

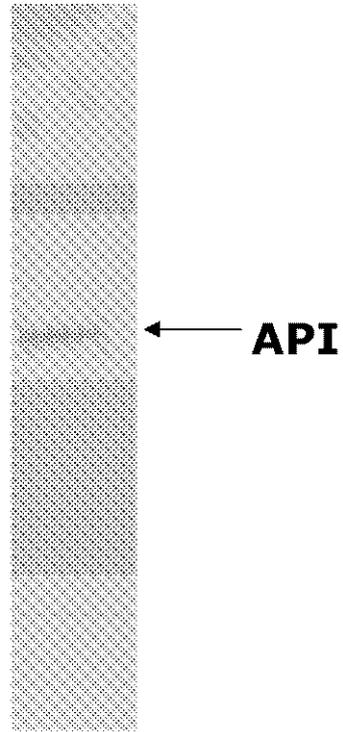


Fig. 5