(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 632 394**

(51) Int. CI.:

C12N 9/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2009 PCT/US2009/064264**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.05.2010 WO10056909**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2009 E 09759839 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2352820**

(54) Título: **Purificación de butirilcolinesterasa usando adsorción a membrana**

(30) Prioridad:

12.11.2008 US 113899 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.09.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

ZAYDENBERG, ALEXANDER;
WEBER, SUSAN;
GAVIT, PATRICK;
LEI, LAURA;
TESCHNER, WOLFGANG;
BUTTERWECK, HARALD;
MAIS-PAUL, URSULA y
SCHWARZ, HANS-PETER

(74) Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

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

Purificación de butirilcolinesterasa usando adsorción a membrana

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad con respecto a la solicitud provisional estadounidense con n.º de serie 61/113.899, presentada el 12 de noviembre de 2008.

Antecedentes de la invención

Los agentes organofosforados (OP) tóxicos suponen un riesgo en contextos tanto civiles como militares. Los agentes OP incluyen gases nerviosos (por ejemplo, somán, sarín, tabún, VX), pesticidas y cocaína. Se cree que estos agentes actúan inhibiendo irreversiblemente la acetilcolinesterasa, lo que puede dar como resultado broncoconstricción, insuficiencia respiratoria y muerte. Los polipéptidos de colinesterasa acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) se han aplicado satisfactoriamente tras la exposición a estos agentes, así como profilácticamente (Doctor *et al*. (2001) Chemical Warfare Agents: Toxicity at low levels, págs. 191-214). En particular, se ha mostrado que BuChE humana protege frente a una amplia gama de agentes. Puede usarse BuChE humana profilácticamente sin tratamiento adicional tras la exposición, y tiene una semivida larga en humanos, roedores y primates (Ostergaard *et al*. (1988) Acta Anaesth. Scand., 32:266-69; Raveh *et al*. (1993) Biochem. Pharmacol. 45:2465-74; Raveh *et al*. (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 145:43-53; Allon *et al*. (1998) Toxicol. Sci. 43:121-28). Debido a que la enzima procede de una fuente humana, el riesgo de una respuesta inmunitaria adversa se minimiza.

Los esfuerzos previos en la purificación de enzimas colinesterasa se han basado en cromatografía en columna aniónica de plasma o pasta de fracción IV de Cohn (véanse por ejemplo, Grunwald *et al*. (1997) J. Biochem. Biophys. Methods 34:123-35; Lockridge *et al*. (2005) J Med Chem Biol Radiol. 3:nihms5095). Para la producción a gran escala, estos métodos requerirían emplear procedimientos de relleno de columnas de cromatografía engorrosos y grandes cantidades de tampones.

Breve sumario de la invención

La presente invención se basa en el hallazgo de que pueden purificarse grandes cantidades de proteínas colinesterasa con alta eficacia usando membranas de intercambio aniónico. Las membranas ofrecen varias ventajas con respecto a la cromatografía en columna para la purificación de proteínas a gran escala. Las membranas pueden tolerar velocidades de flujo más rápidas, lo que reduce el tiempo de proceso para la purificación. Las membranas tienen una capacidad de unión dinámica superior, de modo que se usan volúmenes de medios de adsorción más pequeños para la misma cantidad de proteína total cargada. Además, se requerirán volúmenes más pequeños de tampones por lote producido. Las membranas son más fáciles de aumentar a escala que las columnas, lo que hace que los desarrollos a escala piloto y los esfuerzos de optimización sean más predecibles y relevantes para procesos de fabricación a gran escala. Las membranas son también más fáciles de usar ya que no requieren procedimientos de relleno engorrosos asociados con columnas a escala de producción grandes.

En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos de preparación de una composición de butirilcolinesterasa (BChE) enriquecida a partir de una fuente biológica que tiene BChE, que comprende las etapas de aplicar la fuente biológica que tiene BChE a un material de intercambio aniónico; lavar el material; y eluir BChE del material de intercambio aniónico, en el que la BChE se enriquece tras el intercambio aniónico al menos 10 veces por proteína total en la composición tal como se mide mediante la actividad por proteína total. En algunas realizaciones, la BChE se enriquece al menos 20, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, o más por proteína total, tal como se mide mediante la actividad por proteína total. En algunas realizaciones, el método se aplica a la producción a gran escala de BChE.

En algunas realizaciones, la fuente biológica es un líquido biológico, por ejemplo, sangre o una fracción de la sangre. En algunas realizaciones, el líquido biológico se selecciona del grupo que consiste en plasma, suero y fracción IV de Cohn o subfracciones de la misma. En algunas realizaciones, la fuente biológica es leche (por ejemplo, de un animal transgénico), una célula vegetal o planta transgénica, o una célula recombinante. En algunas realizaciones, la célula recombinante es una célula HEK, COS, C127 o CHO. En algunas realizaciones, la fuente biológica es un órgano, por ejemplo, hígado o riñón. En algunas realizaciones, la fuente biológica es un mamífero, por ejemplo, humano, conejo, caballo, mono, vaca, cabra, oveja, rata o ratón.

En algunas realizaciones, la BChE se purifica por afinidad tras la etapa de elución a partir del material de intercambio aniónico. En algunas realizaciones, el ligando de afinidad se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un análogo de cocaína y procainamida.

En algunas realizaciones, la fuente biológica está en forma líquida y se filtra antes de su aplicación al material de intercambio aniónico. En algunas realizaciones, el material de la fuente biológica se somete a tratamiento con disolvente-detergente. En algunas realizaciones, la fuente biológica es fracción IV de Cohn, en la que la fracción IV

de Cohn se pone en contacto con un compuesto de sílice de combustión, se ajusta a pH 4,0-4,5 y se filtra a través de un medio de filtro.

En algunas realizaciones, el grupo de intercambio aniónico (es decir, el grupo funcional) se une a una membrana o una resina. En algunas realizaciones, el grupo de intercambio iónico se une a una membrana. En algunas realizaciones, el grupo de intercambio iónico es una amina cuaternaria (Q) o dietilaminoetano (DEAE). En algunas realizaciones, dos o más membranas de intercambio aniónico están conectadas en serie.

En algunas realizaciones, la proteína total aplicada a la membrana de intercambio aniónico es de al menos 1000 mg/ml de volumen de membrana. En algunas realizaciones, la proteína total aplicada a la membrana es de al menos 1500, 2000, 2500, 3000, 4000 o más mg/ml de volumen de membrana.

En algunas realizaciones, la velocidad de flujo para la etapa de aplicación es de al menos 1,5 veces el volumen de membrana, por ejemplo, al menos 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, o más, por minuto. En algunas realizaciones, el material de la fuente biológica aplicado al material de intercambio aniónico tiene una conductividad de 2,8 mS/cm o menos. En algunas realizaciones, la conductividad del tampón de lavado es de 3,8 mS/cm o menos. En algunas realizaciones, la conductividad del tampón de elución es de 5,6 mS/cm o más.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de flujo del esquema de purificación usado en los ejemplos.

La figura 2 es un gráfico que compara la columna Q Hyper D con las membranas Q Pall y Sartorius para la recuperación de BChE frente a la velocidad de flujo. La velocidad de flujo se expresa como o bien volumen de columna por minuto (CV/min) o bien volumen de membrana por minuto (MV/min).

La figura 3 ilustra una comparación de los tres medios de intercambio aniónico para la recuperación de BChE frente a la carga de proteína total (TP). TP se expresa como mg de proteína cargada por ml de columna o volumen de membrana.

La figura 4 compara la carga de proteína total para las columnas y ejecuciones de membrana descritas en los ejemplos. La figura ilustra una de las ventajas del presente método, concretamente que las membranas pueden soportar la carga de cantidades mucho más grandes de proteína que las columnas por ml de volumen de lecho.

La figura 5 compara la actividad específica de BChE frente a la carga de TP para cada purificación. La actividad específica se describe como unidades de BChE/mg de proteína.

La figura 6 ilustra el efecto de la conductividad de la proteína cargada sobre la membrana o columna (conductividad de carga) sobre la recuperación de BChE en el eluato. La conductividad se expresa como mS/cm.

La figura 7 muestra el balance de actividad de BChE en tanto por ciento (actividad de BChE en LFT + WFT + eluato como % de la actividad cargada) de las columnas y ejecuciones de membrana. La figura ilustra que se contabiliza significativamente más actividad de BChE en las membranas que en las columnas.

Descripción detallada de la invención

Las colinesterasas se usan como bioeliminadores para contrarrestar los efectos tóxicos de la cocaína y los organofosfatos tales como sarín y otros agentes de guerra química. La invención proporciona un enriquecimiento eficaz de butirilcolinesterasa (BChE) a partir de fuentes biológicas.

A. Definiciones

La butirilcolinesterasa (BuChE) también se denomina colinesterasa no específica, colinesterasa plasmática y pseudocolinesterasa. La enzima humana (denominada hBuChE o Hu BuChE) existe como un tetrámero de 340kD en plasma. Cada monómero tiene 3 puentes disulfuro intercatenarios. Dos monómeros forman un dímero por medio de una unión disulfuro en la cisteína 571, y dos dímeros, a su vez, forman un tetrámero por medio de interacciones hidrófobas. Tal como se usa en el presente documento, BuChE se refiere ampliamente a las formas tetraméricas, diméricas y monoméricas, así como a polipéptidos y multímeros que son sustancialmente idénticos a los polipéptidos de Hu BuChE descritos en los números de registro P06276.1 y Q96HL2.

Tal como se usa en el presente documento, una “muestra biológica” o “fuente biológica” incluye órganos y tejidos, tales como muestras de biopsia y autopsia, y secciones congeladas. Las fuentes biológicas incluyen sangre (incluyendo fracciones de sangre), esputos, tejido, células cultivadas, por ejemplo, cultivos primarios, explantes y células transformadas, orina, etc. Las fuentes biológicas pueden ser o bien procariotas (por ejemplo, una célula bacteriana recombinante) o bien eucariotas, por ejemplo, una célula recombinante, un mamífero (tal como un primate, chimpancé, humano, vaca, perro, gato, un roedor, cobaya, rata, ratón, conejo), un ave, reptil, pez o planta

recombinante.

Tal como se usa en el presente documento, “intercambio aniónico” se refiere a métodos de separación de proteínas basándose en interacciones de carga-carga. Generalmente, el grupo de intercambio aniónico funcional se inmoviliza sobre una matriz sólida o semisólida, por ejemplo, sobre una resina o membrana. Para el intercambio aniónico, el grupo funcional inmovilizado está cargado positivamente y por tanto retiene preferentemente proteínas cargadas negativamente. Ejemplos de grupos funcionales de intercambio aniónico son amina cuaternaria (Q) y dietilaminoetano (DEAE).

Otros grupos funcionales catiónicos adecuados (intercambiadores aniónicos) incluyen aminoetilo (matrices derivatizadas con AE); dimetilaminoetilo (matrices derivatizadas con DMAE); trimetilaminoetilo (matrices derivatizadas con TMAE); dietil-(2-hidroxipropil)aminoetilo (matrices derivatizadas con QAE) y grupos similares. Las matrices de intercambio aniónico catiónicas disponibles comercialmente incluyen: DEAE SEPHADEX (Pharmacia Biotech AB o “PB”), DEAE SEPHACEL (PB), DEAE SEPHAROSE FAST FLOW (PB), DEAE SEPHAROSE CL-6B (PB), DEAE SEPHACEL (PB), DEAE POROS (Perseptive BioSystems), QAE CELLEX (BioRad), QAE SEPHADEX (PB), Q SEPHAROSE FAST FLOW (PB), DEAE BIO-GEL A (BioRad), DEAE Cellulose (Whatman, Pierce), resinas de estireno/divinilbenceno AG & Biorex (BioRad), soportes de intercambio aniónico Macro-Prep (BioRad), Fractogel.RTM. EMD DEAE, TMAC o DEAE (E. Merck), TOYOPEARL DEAE (TosoHaas), TOYOPEARL-QAE (TosoHaas), Q HiperD.RTM. (BioSepra), DEAE TRIS ACRYL.RTM. (BioSepra), DEAE SPHEROSIL.RTM. (BioSepra).

Tal como se usa en el presente documento, “cromatografía de afinidad” se refiere a un método de separación que es específico para una proteína particular o sitio en una proteína. El ligando de afinidad funcional se inmoviliza sobre una matriz sólida o semisólida. Los ejemplos de ligandos de afinidad incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, ligandos naturales o análogos de ligando (por ejemplo, para un receptor particular), y parejas de unión naturales o análogos de las mismas (por ejemplo, para un complejo de múltiples subunidades). En el caso de BChE, los ligandos de afinidad incluyen análogos de cocaína, procainamida, compuestos organofosforados y anticuerpos específicos de BChE. Los ligandos de afinidad pueden incluir funcionalidades de intercambio iónico tales como funcionalidades ácidas para unirse a proteínas cargadas positivamente, o funcionalidades básicas para unirse a proteínas cargadas negativamente. Los ejemplos incluyen, sin limitación, grupos amino (por ejemplo, secundarios, terciarios) y amino cuaternarios, grupos carboxilo, grupos ácido sulfónico, etc. Ligandos de afinidad tales como funcionalidades aldehído y epoxi son útiles para unirse a especies diana que contienen grupos hidroxilo, amino y tiol. En la técnica de purificación se conocen bien ligandos de afinidad y métodos de unión de los mismos a materiales de soporte sólidos. Véanse, por ejemplo, los textos de referencia Affinity Separations: A Practical Approach (Practical Approach Series), Paul Matejtschuk (Editor), Irl Pr: 1997; y Affinity Chromatography, Herbert Schott, Marcel Dekker, Nueva York: 1997.

El término “tampón de lavado” se refiere a un tampón usado para lavar o reequilibrar el material de purificación por afinidad o intercambio iónico, antes de eluir la molécula de polipéptido de interés. El tampón de lavado y tampón de carga pueden emplear la misma matriz, pero no se requiere esto.

El “tampón de elución” se usa para eluir (retirar) el polipéptido de interés del material de purificación por afinidad o intercambio iónico. La conductividad y/o el pH del tampón de elución son tales que el polipéptido de interés se eluye del material.

El término “conductividad” se refiere a la capacidad de una disolución acuosa para conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. En disolución, la corriente fluye mediante transporte iónico. Por tanto, con una cantidad creciente de iones presentes en la disolución acuosa, la disolución tendrá una mayor conductividad. La unidad de medición para la conductividad es miliSiemens/cm (mS/cm), y puede medirse usando un medidor de conductividad disponible comercialmente. La conductividad de una disolución puede alterarse cambiando la concentración de iones en la misma. Por ejemplo, la concentración de un agente tamponante y/o concentración de una sal *(*por ejemplo*,* NaCl o KCl) en la disolución puede alterarse con el fin de lograr la conductividad deseada, tal como se muestra en los ejemplos en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término “filtro” incluye un dispositivo empleado para separación líquido-sólido mediante atrapamiento mecánico y absorción electrocinética (por ejemplo filtración por membrana, diálisis por filtración por membrana, ultrafiltración, diafiltración y nanofiltración). Los materiales de filtro incluyen celulosa, compuestos de sílice, tela, papel, porcelana porosa, carbón, etc. a través de los que se hace pasar líquido para separar las impurezas suspendidas, o materiales de diferentes tamaños y/o pesos. Los ejemplos específicos incluyen medios de filtro de profundidad Zeta Plus (Cuno Corp) y medios de filtro de profundidad Seitz (Pall Corp.)

El término “porcentaje de recuperación”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de proteína recuperada a partir una etapa de purificación o separación particular, expresada como un porcentaje. Por ejemplo, el porcentaje de recuperación puede comparar la cantidad total de proteína aplicada a una etapa de separación con la cantidad total de proteína recuperada, por ejemplo, mediante elución, de la separación. El porcentaje de recuperación puede medirse para una proteína particular comparando la cantidad total de esa proteína

aplicada a la etapa de separación con la cantidad total recuperada, por ejemplo, mediante detección específica por tamaño, inmunoafinidad o ensayo de actividad.

"Identidad sustancial" u "homología sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos el 65 por ciento de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos el 80, el 85, el 90, el 92, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento de identidad de secuencia. Las posiciones de residuos que no son idénticas generalmente difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras.

El término "recombinante" cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado mediante la introducción de una proteína o ácido nucleico heterólogo o la alteración de una proteína o ácido nucleico natural, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Por tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma natural (no recombinante) de la célula o expresan genes naturales que por lo demás se expresan de manera anómala, se subexpresan o no se expresan en absoluto. Por el término "ácido nucleico recombinante" en el presente documento quiere decirse ácido nucleico, originalmente formado *in vitro,* en general, mediante la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, usando polimerasas y endonucleasas. De esta manera, se logra la unión operativa de diferentes secuencias. Se entiende que una vez que se prepara un ácido nucleico recombinante y se reintroduce en un organismo o célula huésped, se replicará de manera no recombinante, es decir, usando la maquinaria celular *in vivo* de la célula huésped en vez de manipulaciones *in vitro*. De manera similar, una "proteína recombinante" es una proteína preparada usando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante tal como se representó anteriormente.

El término "transgénico" se usa para describir una célula u organismo generado usando métodos recombinantes. Generalmente, un organismo o célula transgénica portará un "transgén", o ácido nucleico no endógeno.

La frase "se une específicamente (o selectivamente)" a un anticuerpo u otro compuesto, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína, a menudo en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por tanto, en las condiciones de ensayo designadas, el compuesto o anticuerpo especificado se une a la proteína al menos dos veces el fondo y más normalmente más de 10 a 100 veces el fondo. La unión específica a un anticuerpo en tales condiciones requiere un anticuerpo que se selecciona por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, pueden seleccionarse anticuerpos policlonales generados frente a un polipéptido complejo o monómero de BChE, variantes polimórficas, alelos, ortólogos y variantes modificadas de manera conservadora, o variantes de corte y empalme, o porciones de las mismas, para obtener sólo los anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con BChE, y no con otras proteínas. Esta selección puede lograrse restando anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con otras moléculas. Puede usarse una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan de manera rutinaria inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988) para una descripción de formatos de inmunoensayo y condiciones que pueden usarse para determinar la inmunorreactividad específica).

B. Butirilcolinesterasa

La butirilcolinesterasa (BChE) existe como un tetrámero de 340 kD en el plasma sanguíneo. BChE metaboliza cocaína, heroína y organofosfonatos tóxicos, y es útil para prevenir y reducir la intoxicación y toxicidad (véanse, por ejemplo, Raveh *et al*. (1993) Biochem. Pharmacol. 45:2465-74; Mattes *et al*. (1996) Pharmacol. Lett. 58:257-61). También se ha mostrado que BChE se une a fibrillas de amiloide beta (Podoly *et al*. (2008) Neurodeger. Dis. 5:232-36).

En algunas realizaciones, se modifica BChE para mejorar su tiempo de retención en la circulación. Esto es particularmente útil para usos profilácticos, en donde el momento y la duración de la exposición a la toxina son inciertos. La unión de un polímero soluble en agua, farmacéuticamente aceptable, tal como polietilenglicol (PEG) mejora el tiempo de retención de la enzima *in vivo*. Los polímeros a modo de ejemplo incluyen mezclas de PEG farmacéuticamente aceptables, poli(óxidos de alquileno) terminados en alcoxilo monoactivados, dextrano, polivinilpirrolidonas, poliacrilamidas, poli(alcoholes vinílicos) y polímeros a base de hidratos de carbono. Se describen métodos de unión, por ejemplo, en el documento WO02/087624. Por ejemplo, las aminas primarias en BChE pueden seleccionarse como diana con metoxi-PEG activado en exceso molar. En algunos casos, el tiempo de retención medio de la enzima puede aumentarse 5, 10 e incluso 50 veces, en comparación con BChE no modificada.

BChE puede o bien producirse de manera natural, es decir, aislarse de fuentes endógenas, o bien producirse de manera recombinante. Las fuentes endógenas incluyen humano, conejo, rata, bovino, caballo, oveja, etc. Generalmente, se aísla BChE de la sangre o fracciones sanguíneas, aunque puede aislarse BChE de tejido o extractos de órganos también (por ejemplo, hígado, bazo, pulmón, médula ósea, riñón, placenta, etc.).

Las preparaciones sanguíneas con niveles significativos de BChE incluyen suero y fracciones de plasma. Puede

aislarse BChE de subfracciones de estos elementos también. Una técnica de separación de sangre bien conocida es fraccionamiento de Cohn, tal como se describe en Harris, Blood Separation and Plasma Fractionation Wiley-Liss (1991). Según el método de Cohn (y variaciones recientes del mismo), se separan proteínas de la sangre en cinco fracciones basándose en una concentración de etanol, pH y temperatura variables. Se concentra BChE en la fracción IV, y en determinadas subfracciones de la fracción IV (por ejemplo, IV-4, IV-6). Las fracciones de Cohn pueden almacenarse congeladas, como pastas, y pueden resuspenderse para su uso en los métodos de la invención.

Las técnicas recombinantes pueden ser ventajosas para producir BChE a gran escala. Tales técnicas se conocen bien en la técnica, y se describen generalmente, por ejemplo, en Ausubel *et al*., Current Protocols in Molecular Biology (suplemento de 1995); y Sambrook *et al*. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed., (1989). En resumen, se introduce un casete de expresión que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica la BChE, operativamente unido a un promotor, dentro de una célula en condiciones que son favorables para la expresión de BChE.

E. coli es una célula huésped procariota útil para técnicas de expresión recombinante. Otros huéspedes microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras *enterobacteriaceae*, tales como *Salmonella, Serratia* y diversas especies de *Pseudomonas*. Se introduce un vector de expresión recombinante en los huéspedes procariotas, que contienen generalmente secuencias de control de la expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación). Además, puede estar presente cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos, tales como el sistema de promotor de lactosa, un sistema de promotor de triptófano (trp), un sistema de promotor de beta-lactamasa o un sistema de promotor de fago lambda. Los promotores normalmente controlan la expresión, opcionalmente con una secuencia de operador, y tienen secuencias de sitio de unión al ribosoma y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción.

Otros microbios, tales como levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*), pueden usarse también para la expresión. Las levaduras tienen una gran cantidad de vectores adecuados con secuencias de control de la expresión, tales como promotores, incluyendo 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, y un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee.

También pueden usarse cultivos de células vegetales y plantas para la expresión recombinante de BChE (Larrick y Fry, Hum. Antibodies Hybridomas 2:172-189 (1991); Benvenuto *et al*., Plant Mol. Biol. 17:865-874 (1991); During *et al*., Plant Mol. Biol. 15:281-293 (1990); Hiatt *et al*., Nature 342:76-78 (1989)). Los huéspedes vegetales incluyen, por ejemplo: *Arabidopsis, Nicotiana tabacum, Nicotiana rustica* y *Solahum tuberosum.* Un casete de expresión a modo de ejemplo es el plásmido pMOG18, por ejemplo, según el método de Sijmons *et al*., Bio/Technology 8:217-221 (1990). También pueden usarse vectores basados en ADN T de *Agrobacterium tumifaciens* para expresar secuencias que codifican la BChE; preferentemente tales vectores incluyen un gen marcador que codifica la resistencia a espectinomicina u otro marcador seleccionable.

También puede usarse el cultivo de células de insecto para expresar BChE, normalmente usando un sistema de expresión basado en baculovirus, por ejemplo, según los métodos de Putlitz *et al*., Bio/Technology 8:651-654 (1990).

Además de microorganismos y plantas, también puede usarse el cultivo de células de mamífero para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (véase Winnacker, “From Genes to Clones”, VCH Publishers, Nueva York (1987)). Las células de mamífero incluyen células HEK-293, las líneas celulares CHO, diversas líneas celulares COS, células HeLa, líneas celulares de mieloma, etc. (véase, por ejemplo, Lynch *et al*. (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 145:363-71 para la expresión de BChE en células HEK). Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen *et al*., Immunol. Rev. 89:49-68 (1986)) y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de corte y empalme del ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminador de la transcripción. Las secuencias de control de la expresión incluyen promotores derivados de SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares. Un marcador seleccionable, tal como un casete de expresión neo, puede incluirse también en el vector de expresión.

También puede expresarse BChE y purificarse a partir de la leche de un mamífero transgénico. Tales técnicas se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense 7.045.676. Se describen en más detalle estrategias generales y transgenes a modo de ejemplo que emplean secuencias reguladoras de αS1-caseína para dirigir la expresión de una proteína recombinante a la glándula mamaria en los documentos WO 91/08216 y WO 93/25567. Los ejemplos adicionales de transgenes que emplean secuencias reguladoras específicas de glándula mamaria incluyen Simon *et al*., Bio/Technology 6:179-183 (1988) y los documentos WO88/00239 (1988); EP 279.582 y Lee *et al*., Nucleic Acids Res. 16:1027-1041 (1988).

C. Técnicas de purificación de proteínas

Las técnicas de purificación de proteínas incluyen, por ejemplo, métodos que utilizan la solubilidad (tales como precipitación con sales y precipitación con disolventes), métodos que utilizan la diferencia en peso molecular (tales

como diálisis, ultrafiltración, filtración en gel y electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida), métodos que utilizan una diferencia en la carga eléctrica (tales como cromatografía en columna de intercambio iónico), métodos que utilizan una interacción específica (tales como cromatografía de afinidad), métodos que utilizan una diferencia en hidrofobicidad (tales como cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa) y métodos que utilizan una diferencia en el punto isoeléctrico (tales como electroforesis de isoelectroenfoque). Los recursos de referencia incluyen: Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer Press, 3ª edición (1994) y Abelson *et al.*, Methods in Enzymology, volumen 182: Guide to Protein Purification, Academic Press (1990).

Las proteínas expresadas en bacterias pueden formar agregados insolubles ("cuerpos de inclusión"). Varios protocolos son adecuados para la purificación de cuerpos de inclusión de BChE. Por ejemplo, la purificación de cuerpos de inclusión implica normalmente la extracción, separación y/o purificación de cuerpos de inclusión mediante la rotura de células bacterianas, por ejemplo, mediante incubación en un tampón de TRIS/HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, $MgCl_2$ 5 mM, DTT 1 mM, ATP 0,1 mM y PMSF 1 mM. La suspensión de células puede lisarse usando 2-3 pases a través de una prensa francesa, homogeneizarse usando un instrumento Politron (Brinkman Instruments) o sonicarse sobre hielo. Métodos alternativos de lisis de bacterias son evidentes para los expertos en la técnica (véanse por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2ª ed. 1989); Ausubel *et al.* Current Protocols in Molecular Biology (suplemento de 1995)).

Si es necesario, los cuerpos de inclusión se solubilizan, y la suspensión de células lisadas se centrifuga normalmente para eliminar la materia insoluble no deseada. Las proteínas que formaron los cuerpos de inclusión pueden renaturalizarse mediante dilución o diálisis con un tampón compatible. Los disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a urea (desde aproximadamente 4 M hasta aproximadamente 8 M), formamida (al menos aproximadamente al 80%, base en volumen/volumen) y clorhidrato de guanidina (desde aproximadamente 4 M hasta aproximadamente 8 M). Algunos disolventes que pueden solubilizar proteínas que forman agregados, por ejemplo SDS (dodecilsulfato de sodio), ácido fórmico al 70%, son inapropiados para su uso en este procedimiento debido a la posibilidad de desnaturalización irreversible de las proteínas, acompañada por una falta de inmunogenicidad y/o actividad. Aunque el clorhidrato de guanidina y agentes similares son desnaturalizantes, esta desnaturalización no es irreversible y puede producirse renaturalización tras la retirada (mediante diálisis, por ejemplo) o dilución del desnaturalizante, permitiendo que vuelva a formarse una proteína inmunológica y/o biológicamente activa. Los expertos en la técnica conocen otros tampones adecuados. Se separan polipéptidos de BChE de otras proteínas bacterianas mediante técnicas de separación convencionales, por ejemplo, con resina de agarosa Ni-NTA.

Alternativamente, es posible purificar polipéptidos de BChE a partir de periplasma bacteriano. Tras la lisis de las bacterias, cuando se exporta la BChE al interior del periplasma de las bacterias, puede aislarse la fracción periplásmica de las bacterias mediante choque osmótico en frío además de otros métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Para aislar proteínas recombinantes del periplasma, las células bacterianas se centrifugan para formar un sedimento. El sedimento se resuspende en un tampón que contiene sacarosa al 20%. Para lisar las células, las bacterias se centrifugan y el sedimento se resuspende en $MgSO_4$ 5 mM enfriado con hielo y se mantiene en un baño de hielo durante aproximadamente 10 minutos. Se centrifuga la suspensión de células y se decanta el sobrenadante y se guarda. Las proteínas recombinantes presentes en el sobrenadante pueden separarse de las proteínas del huésped mediante técnicas de separación convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica.

A menudo, como etapa inicial, particularmente si la mezcla de proteínas es compleja, un fraccionamiento con sal inicial puede separar muchas de las proteínas de la célula huésped no deseadas (o proteínas derivadas de los medios de cultivo celular) de la proteína recombinante de interés. Se usa comúnmente sulfato de amonio, ya que precipita proteínas reduciendo eficazmente la cantidad de agua en la mezcla de proteínas. Las proteínas precipitan entonces basándose en su solubilidad. Cuando más hidrófoba es una proteína, más probable es que precipite a concentraciones de sulfato de amonio inferiores. Un protocolo típico incluye añadir sulfato de amonio saturado a una disolución de proteína de modo que la concentración de sulfato de amonio resultante sea de entre el 20-30%. Esta concentración precipitará las proteínas más hidrófobas. El precipitado se desecha entonces (a menos que la proteína de interés sea hidrófoba) y se añade sulfato de amonio al sobrenadante hasta una concentración conocida para precipitar la proteína de interés. Entonces se solubiliza el precipitado en tampón y se elimina la sal en exceso si es necesario, o bien a través de diálisis o bien de diafiltración. Otros métodos que se basan en la solubilidad de las proteínas, tales como precipitación con etanol en frío, los conocen bien los expertos en la técnica y pueden usarse para fraccionar mezclas de proteínas complejas.

El peso molecular de BChE o polipéptidos complejos de BChE puede usarse para aislarlos de proteínas de mayor y menor tamaño usando ultrafiltración a través de membranas de diferente tamaño de poro (por ejemplo, membranas Amicon o Millipore). Como primera etapa, la mezcla de proteínas se somete a ultrafiltración a través de una membrana con un tamaño de poro que tiene un valor de corte de peso molecular inferior al peso molecular de la proteína de interés. La porción retenida de la ultrafiltración se somete entonces a ultrafiltración frente a una membrana con un valor de corte molecular mayor que el peso molecular de la proteína de interés. La proteína recombinante pasará a través de la membrana al interior del filtrado. El filtrado puede someterse entonces a técnicas de separación y purificación adicionales.

Pueden separase polipéptidos de BChE de otras proteínas basándose en su tamaño, carga de superficie neta, hidrofobicidad y afinidad por sustratos y ligandos. Además, pueden conjugarse anticuerpos generados contra proteínas BChE con matrices de columna e inmunopurificarse las proteínas. Se conocen en la técnica métodos de cromatografía que pueden usarse para estas técnicas (tales como FPLC y HPLC). Resultará evidente para un experto que puede realizarse cromatografía a cualquier escala y usando equipos de muchos fabricantes diferentes (por ejemplo, Pharmacia Biotech).

Puede usarse intercambio iónico para separar proteínas basándose en la carga neta. BChE está cargada negativamente a pH convencionales, y se somete ventajosamente a cromatografía de intercambio aniónico. En una realización el pH se ajusta a 4,0-4,5 para la unión. En otra realización el pH se ajusta a 4,15-4,35. Ejemplos de grupos de intercambio aniónico funcionales son DEAE y mono Q. MonoQ proporciona una interacción iónica verdadera sin interferencia de unión de hidrógeno o interacciones electrostáticas con la proteína. Las formas conjugadas de estos materiales están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Pall, Sartobind, Pharmacia Biotech y Sigma-Aldrich.

El intercambio iónico es altamente sensible al pH, e, idealmente, el pH es al menos una unidad superior al punto isoeléctrico de la proteína de interés. Generalmente se realiza una curva de valoración usando la proteína de interés para determinar el mejor pH para lograr una unión óptima entre el grupo funcional y la proteína. Tampones a modo de ejemplo comúnmente usados en el intercambio iónico de proteínas son acético, cítrico, Mes, fosfato, Hepes, L-histidina, imidazol, trietanolamina, Tris, dietanolamina. Los contraiones adecuados incluyen sodio, potasio, cloruro, bromo, hidrógeno, acetato y maleato. Pueden añadirse cantidades variables de sal, por ejemplo, cloruro de sodio, al tampón tal como se describe a continuación. El intervalo de tamponamiento del pH de los tampones mencionados anteriormente es de desde 4,0 hasta 8,8. En una realización, se usa acetato como tampón de lavado incluyendo uno o más lavados cloruro de sodio. En una realización, se usa acetato de sodio 35 mM con cloruro de sodio 20 mM y cloruro de sodio 150 mM, respectivamente. En otra realización, se usa un único lavado de acetato de sodio 35 mM con cloruro de sodio 150 mM.

La conductividad de la disolución aplicada al medio de intercambio aniónico también es importante para lograr la unión óptima, y puede variarse cambiando la concentración de sal de la disolución. La conductividad del tampón de lavado también se optimiza generalmente para lograr el lavado óptimo de las impurezas y proteínas no deseadas, al tiempo que se retiene la unión de la proteína de interés. Los tampones de elución para intercambio aniónico tienen generalmente una conductividad superior con el fin de romper la interacción iónica entre la proteína y el grupo funcional. Estos principios se ilustran en más detalle en los ejemplos a continuación.

También pueden separarse polipéptidos de BChE de otros materiales basándose en su afinidad por sustratos, ligandos, anticuerpos específicos o fragmentos de anticuerpos específicos.

Puede purificarse BChE usando procainamida conjugada, por ejemplo, con una resina, membrana u otro medio inmóvil. Se describen métodos de generación de resina de procainamida-sepharose y separación de BChE, por ejemplo, en Grunwald *et al*. (1997) J Biochem Biophys Methods 34:123-35 y Lockridge & La Du (1978) J. Biol. Chem. 253:361-66. La elución de BChE puede lograrse mediante la adición de procainamida libre, que se separa posteriormente.

Se conocen en la técnica varios anticuerpos específicos para BChE y están disponibles comercialmente. Estos incluyen 002-01, 6F41, 3E8, C-15, C-18, N-13 y HPA001560, disponibles de Santa Cruz Biotechnology y Sigma-Aldrich. Cualquiera de estos anticuerpos o fragmentos de unión a BChE específicos de los mismos pueden unirse a un sustrato inmovilizado para su uso en purificación tal como se conoce en la técnica.

D. Métodos de almacenamiento

La proteólisis de BChE puede transformar el tetrámero en dímeros y monómeros con grupos SH libres, lo que acelerará el aclaramiento de BChE de la sangre. Por tanto, es importante almacenar BChE purificada en condiciones controladas, en una disolución de tamponamiento adecuada. Por ejemplo, puede almacenarse BChE durante varios meses a 4ºC en tampón Tris, pH 7,4-8,0, o tampón fosfato, pH 7,4-8,0, con EDTA 1 mM (véase por ejemplo, Grunwald *et al*. (1997) J Biochem Biophys Methods 34:123-35). BChE también puede liofilizarse o secarse por congelación y almacenarse durante varios meses sin pérdida significativa de actividad. Se conocen en la técnica métodos de almacenamiento de proteínas, y sistemas de tamponamiento apropiados.

E. Métodos de determinación de la cantidad y pureza de proteínas

La concentración de proteína puede determinarse usando métodos convencionales, tales como el método de Lowry usando una calibración con BSA u otro patrón (véanse, por ejemplo, Scopes, citado anteriormente; Grunwald, citado anteriormente). La concentración y el contenido de una disolución de proteína también pueden determinarse mediante electroforesis en gel o capilar.

F. Métodos de determinación de la actividad colinesterasa

Las colinesterasas pueden unirse a gases nerviosos (por ejemplo, somán, sarín, tabún, VX), pesticidas, cocaína y heroína, y catabolizar los compuestos. Pueden medirse la unión al sustrato y la cinética de unión mediante cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo, usando un análogo marcado de manera detectable de un compuesto seleccionado como diana (véase, por ejemplo, Lockridge & Du Lu (1978) J. Biol. Chem. 253:361-66). La actividad hidrolítica de BChE se mide generalmente usando la técnica de Ellman *et al*. (1961) Biochem Pharmacol 7:88-95. En resumen, se añade BChE a BTC en tampón fosfato a pH 8,0 a temperatura ambiente. Una actividad de una unidad se expresa generalmente como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1 μmol/min. La actividad de BChE también puede someterse a prueba usando diferentes sustratos, por ejemplo, cocaína o benzoilcolina (véanse Mattes *et al*. (1996) Pharmacol. Lett. 58:257-61; Lockridge & Du Lu, citado anteriormente). La actividad puede valorarse, por ejemplo, valorando una disolución con concentración de BChE desconocida.

G. Ejemplos

1. Materiales y métodos

Los siguientes estudios representan evaluaciones a baja escala del reemplazo de una resina de intercambio aniónico Q Hyper D por una membrana Q para la purificación de BChE. Se sometieron a prueba membranas Pall Mustang y Sartorius MA durante la etapa de purificación por intercambio aniónico. Los parámetros de membrana se describen en la tabla 1.

TABLA 1		Unidades	Pall Mustang Q XT5	Sartorius Sartobind MA 100	Sartorius Sartobind MA 15
Material de membrana			Polietersulfona hidrófila modificada	Celulosa estabilizada reforzada	
Parámetros técnicos	Área de absorción eficaz	cm^2	N/A	100	15
	Altura de lecho	mm	2,2	1,40	0,80
	Volumen de lecho	ml	5	2,75	0,41
	Capas		N/A	5	3
	Tamaño de poro	um	N/A	> 3	> 3
Condiciones operativas	Velocidad de flujo	ml/min	50	> 75	> 50
	Presión de funcionamiento máxima	psi	75	87	
	Preacondicio-namiento		NaCl 2 M; HAc 0,5 M, NaOH 0,5 N		
	Uso		Reutilizable	Reutilizable	Reutilizable
Condiciones de almace-namiento			NaOH 0,1 M + NaCl 1 M	Etanol al 20% + NaCl al 0,9%	

El presente estudio de viabilidad se realizó con el fin de conseguir una comprensión más profunda de una etapa de cromatografía de membrana Q en lugar de la cromatografía de intercambio aniónico para la purificación de BuChE. Se encontró que la cromatografía de membrana mejora la recuperación y minimiza la pérdida de producto con respecto a los siguientes parámetros de proceso críticos: velocidad de flujo, volumen de membrana, y carga de proteína total (TP).

Cada ejecución a baja escala consistía en las siguientes etapas, tal como se explica resumidamente en la figura 1:

(1) Se suspende una parte de precipitado de fracción IV-4 de Cohn en tres partes (o más) de agua para inyección (WFI) y se mezclan;

(2) se añade sílice de combustión (Aerosil) a la suspensión y se ajusta el pH a de 4,15 a 4,35 con ácido acético 5 N;

(3) entonces se filtra la suspensión por medio de almohadillas filtrantes Cuno en un filtro prensa usando acetato de sodio 35 mM, pH 4,15 a 4,35 tampón de postlavado;

(4) se añade mezcla de disolvente/detergente (SD) al filtrado; y

(5) se realiza la cromatografía de membrana Q usando membranas con volúmenes de lecho de 5 ml, 2,75 ml y 0,41 ml para cada conjunto sucesivo de ejecuciones.

Se ajustaron estos parámetros de proceso básicos para cada experimento con membrana tal como sigue:

Ejecución n.º 1

Se realizaron las ejecuciones n.º 1-9 por separado de las ejecuciones n.º 10-11. La ejecución 1 era una repetición de la ejecución n.º 11 (más adelante) usando una preparación de filtrado de fracción IV de Cohn (Fr. IV-4) nueva y una membrana Pall Q Mustang nueva. Tanto el tampón como el material de carga se diluyeron con WFI hasta una conductividad de 1,7 mS/cm. La carga de proteína total era de 1635 mg por ml de volumen de membrana (MV). La velocidad de flujo era de 3,2 MV/min (15,9 ml/min). Se eluyó la proteína con tampón acetato de sodio 35 mM con dos concentraciones de NaCl: 20 mM seguido de 150 mM.

Ejecución n.º 2

Se reutilizó la membrana Pall Q Mustang de 5 ml del experimento anterior (ejecución n.º 1). No se realizaron diluciones ni en el tampón ni en el material de carga (la conductividad del tampón era de 3,1 mS/cm y del material de carga era de 2,8 mS/cm). La carga de proteína total era de 1080 mg por ml de volumen de membrana (MV). La velocidad de flujo era de 3,2 MV/min (15,9 ml/min). Se eluyó la proteína con tampón acetato de sodio 35 mM y NaCl 150 mM.

Ejecución n.º 3

Se usó una membrana Sartorius X100 de 2,75 ml nueva. No se diluyeron ni el tampón ni el material de carga (la conductividad del tampón era de 3,7 mS/cm y del material de carga era de 2,6 mS/cm). La carga de proteína total era de 2335 mg por ml de volumen de membrana. La velocidad de flujo era de 5,8 MV/min (15,9 ml/min). Se eluyó la proteína con tampón acetato de sodio 35 mM y NaCl 150 mM.

Ejecución n.º 4

Se reutilizó la membrana Sartorius X100 de 2,75 ml del experimento anterior (ejecución n.º 3). Tanto el tampón como el material de carga se diluyeron con WFI hasta una conductividad de 1,7 mS/cm. La carga de proteína total era de 1301 mg por ml de volumen de membrana. La velocidad de flujo era de 1,5 MV/min (4,0 ml/min). Se eluyó la proteína con tampón acetato de sodio 35 mM y NaCl 150 mM.

Ejecución n.º 5

Se usó una membrana Sartorius X100 de 2,75 ml nueva. No se realizaron diluciones ni en el tampón ni en el material de carga (la conductividad del tampón era de 3,8 mS/cm y del material de carga era de 2,7 mS/cm). La carga de proteína total era de 2246 mg por ml de volumen de membrana. La velocidad de flujo era de 2 a 4,4 MV/min (de 5,5 a 12,0 ml/min). Se eluyó la proteína con tampón acetato de sodio 35 mM y NaCl 150 mM.

Ejecución n.º 6

Se usó una membrana Sartorius X15 de 0,41 ml nueva. No se diluyeron ni el tampón ni el material de carga (la conductividad del tampón era de 3,8 mS/cm y del material de carga era de 2,7 mS/cm). La carga de proteína total era de 2098 mg por ml de volumen de membrana. La velocidad de flujo era de 4,1 MV/min (1,7 ml/min). Se eluyó la proteína con tampón acetato de sodio 35 mM y NaCl 150 mM.

Ejecución n.º 7

Ésta fue una repetición del experimento anterior (ejecución n.º 6) usando la misma membrana Sartorius X15 de 0,41 ml. La carga de proteína total era de 2167 mg por ml de volumen de membrana.

Ejecución n.º 8

Ésta fue una repetición de los experimentos anteriores (ejecuciones n.º 6 y n.º 7) usando la misma membrana Sartorius X15 de 0,41 ml. La carga de proteína total era de 2169 mg por ml de volumen de membrana.

Ejecución n.º 9

Ésta fue una repetición de los experimentos anteriores (ejecuciones n.º 6 a n.º 8) usando la misma membrana Sartorius X15 de 0,41 ml. La carga de proteína total era de 2295 mg por ml de volumen de membrana.

Ejecución n.º 10

Se realizó la ejecución n.º 10 junto con un esquema de aislamiento similar usando cromatografía en columna de intercambio catiónico Q, descrita a continuación. En la ejecución n.º 10, se usó una membrana Pall Q Mustang de

5 ml nueva. Se diluyó el tampón acetato de sodio 35 mM, pH 4,2 con WFI hasta una conductividad de 1,9 mS/cm y se usó para el equilibrado y el lavado. Se diluyó el material de carga (filtrado de IV-4 tratado con SD) con WFI hasta una conductividad de 1,8 mS/cm antes de cargar. La carga de proteína total era de 4844 mg por ml de volumen de membrana. La velocidad de flujo era de 3,2 MV/min (15,9 ml/min). Se eluyó la proteína con tampón acetato de sodio 35 mM con dos concentraciones de NaCl: 20 mM seguido de 150 mM.

Ejecución n.º 11

Se reutilizó la membrana Pall Q Mustang de 5 ml del experimento anterior (ejecución n.º 10). Tanto el tampón como el material de carga se diluyeron con WFI hasta una conductividad de 1,7 mS/cm. La carga de proteína total era de 1273 mg por ml de volumen de membrana. La velocidad de flujo era de 3,2 MV/min (15,9 ml/min). Se eluyó la proteína con tampón acetato de sodio 35 mM con dos concentraciones de NaCl: 20 mM seguido de 150 mM.

Se compararon los resultados del esquema de aislamiento anterior con los del uso de cromatografía en columna de intercambio aniónico. Se llevó a cabo la cromatografía en columna sobre resina de intercambio aniónico Q Hyper D junto con la ejecución de membrana n.º 10, descrita anteriormente. De manera similar al aislamiento en membrana, el esquema de aislamiento en columna comenzó con tratamiento con disolvente-detergente del filtrado de Aerosil. Se limpió la columna de medio Q con NaCl 2 M, ácido acético 0,5 M y NaOH 0,5 N antes del equilibrado con acetato de sodio 35 mM, pH 4,25. Después de eso, se cargó el filtrado tratado con disolvente-detergente sobre la columna. Entonces se lavó la columna con acetato de sodio 35 mM, pH 4,25, luego el tampón acetato de sodio con NaCl 20 mM para eliminar por lavado las impurezas. Se realizó la elución con tampón acetato de sodio con NaCl 150 mM. Una vez eluida la proteína, la columna puede regenerarse con NaCl 2 M, ácido acético 0,5 M y NaOH 0,5 N y almacenarse en EtOH al 20% con NaCl 1 M.

2. Resultados

La tabla 2 proporciona un resumen de los resultados descritos a continuación. Se usan las siguientes abreviaturas: MV= volumen de membrana (también volumen de columna); Cond.= conductividad; TP= proteína total; actividad espec.= actividad de BChE específica; LFT= fracción no retenida de la carga; y WFT= fracción no retenida del lavado, balance total= actividad de BChE en LFT + WFT + eluato como % de la actividad cargada.

Tabla 2

Ejecución	Medio	MV (ml)	Condiciones de carga					Lavado	Elución	Actividad de BChE				
			Velocidad de flujo		TP, conc.	TP cargada	Cond.	Cond.	Cond.	Entrada	Recuperación	Pérdida en LFT+WFT	Balance total	Actividad espec.
			MV/min	ml/min	mg/ml	mg/ml de MV	mS/cm	mS/cm	mS/cm	U/ml	%	%	%	U/mg
Gel Q Hyper D		64/82	0,1-0,25		7,8-13,7	360-600	1,4-3,0			4,2-7,2	38-57	20-42	de 66 a 80	52-17
10	Pall	5	3,2	15,9	12,1	4844	1,8	1,9	5,6-18	7,0	42,8	49,8	96	84
11					12,6	1273	1,7	1,7	5,6-18	7,2	64,4	17,3	89	56
1					5,2	1635	1,7	1,7	7,5-22,7	2,1	64,3	27,5	92	27
2					9,0	1080	2,8	3,1	22,7	4,0	51,1	36,1	87	59
Intervalo para Pall					5,2-12,6	1080-4844	1,7-2,8	1,7-3,1	5,6-22,7	2,1-7,2	42,8-64,4	17,3-49,8	87-96	27-84
Promedio para Pall											55,7	32,7	91	56
3	Sartor.	2,75	5,8	15,9	10,7	2335	2,6	3,7	23	4,2	71,4	32,2	104	70
4			1,5	4,0	4,9	1301	1,7	1,7	23	2,2	43,2	31,4	75	53
5			2-4,4	5,5-12	10,3	2246	2,7	3,8	23	4,1	43,6	36,4	80	87
Intervalo para Sartorius de 2,75 ml					4,9-10,7	1301-2335	1,7-2,6	1,7-3,8	23	2,2-4,2	43,2-71,4	31,4-36,4	75-104	53-87
Promedio para Sartorius de 2,75 ml											52,7	33,3	86	70
6	Sartor.	0,41	4,1	1,7	10,0	2098	2,7	3,8	N/R	3,6	46,9	44,1	91	59
7			3,7	1,5	10,3	2167				sin datos	sin datos	sin datos	sin datos	sin datos
8			3,4	1,4	10,3	2169				3,8	35,8	36,8	73	44
9			3,4	1,4	10,9	2295				3,6	46,1	42,7	89	59
Intervalo para Sartorius de 0,41 ml					10,0-10,9	2098-2295				3,6-3,8	35,8-46,9	36,8-44,1	73-91	44-59
Promedio para Sartorius de 0,41 ml											42,9	41,2	84	54

Se compararon las recuperaciones de BChE entre la columna y diversas membranas Q basándose en la velocidad de flujo a través del medio. Tal como se observa en la figura 2, se observaron velocidades de flujo significativamente superiores en las membranas en comparación con la columna sin impacto negativo sobre la recuperación de BChE. Se dedujo que las velocidades de flujo para las membranas podrían ser más de 10 veces superiores a las de las columnas. La ventaja de usar membranas radica en el tiempo reducido necesario para llevar a cabo las ejecuciones, especialmente dada la mayor cantidad de proteína cargada sobre las membranas (véase la tabla 2). Por tanto, la recuperación no se ve comprometida en ninguna.

A continuación se comparó la columna Q con las membranas Pall y Sartorius para determinar la cantidad de BChE recuperada frente a la proteína total (TP) cargada. Véase la figura 3. Las columnas están limitadas en lo que se refiere a la cantidad de proteína que puede cargarse sin comprometer la retención de la cantidad total de proteína cargada sobre el gel. La pérdida de retención daría como resultado pérdidas de BChE en LFT y un bajo % de recuperación de BChE. Sin embargo, las membranas pueden alojar cantidades mucho mayores de proteína sin pérdida de recuperación, tal como se muestra en la figura 3. La tabla 2 proporciona una comparación conjunta de las cargas de TP, y muestra que podría cargarse hasta 10 veces más proteína sobre las membranas. Por tanto, la retención de la carga de TP es más eficaz en las membranas que en la columna.

La figura 4 proporciona apoyo adicional para esta ventaja de purificación en membrana. La figura 4 muestra la cantidad de TP cargada para todas las ejecuciones (ejecuciones de columna Q, ejecuciones de Pall y ejecuciones de Sartorius). Tal como se muestra para la “Membrana 10” (correspondiente a la ejecución n.º 10 anterior), podría cargarse más de 5 veces más proteína sobre la membrana.

La figura 5 compara la actividad específica de BChE recuperada de cada una de las ejecuciones. Se encontró que la carga de proteína significativamente superior lograda para las membranas no tiene un efecto perjudicial sobre la actividad específica de BChE.

A continuación se observó el efecto de la conductividad de la disolución de proteína cargada sobre la recuperación de BChE. Tal como se muestra en la figura 6, la conductividad de la disolución de proteína inicial no estaba correlacionada con la recuperación.

La figura 7 demuestra otra ventaja de las membranas con respecto a las columnas para la etapa de intercambio aniónico. Se observó un balance de actividad de BChE significativamente superior (actividad de BChE total en LFT + WFT + eluato como % de la actividad cargada) en las membranas, lo que indica que podría contabilizarse más de la BChE cargada al final. Esta observación conduce a la posibilidad de mejorar significativamente la recuperación de BChE, conectando dos o más membranas Q en serie.

3. Conclusiones

Los resultados anteriores indicaron los siguiente:

Las membranas funcionaban a velocidades de flujo significativamente superiores (0,1-0,25 CV/min en columnas frente a 1,5 - 5,8 MV/min en membranas);

las membranas pueden soportar hasta 10 veces más proteína cargada;

el balance de actividad de BChE total es más pronunciado en las membranas (el 91% para la membrana Pall, el 85% para Sartorius, y el 73% para las columnas); y

las membranas no requerían la preparación de grandes cantidades de tampones.

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar una composición de butirilcolinesterasa enriquecida a partir de una fuente biológica que tiene butirilcolinesterasa, comprendiendo el método las etapas de:

aplicar la fuente biológica que tiene butirilcolinesterasa a un material de intercambio aniónico unido a una membrana;

lavar el material; y

eluir la butirilcolinesterasa del material de intercambio aniónico, en el que el contenido de butirilcolinesterasa se enriquece tras el intercambio aniónico al menos 10 veces por proteína total en la composición tal como se mide mediante la actividad butirilcolinesterasa por proteína total.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la fuente biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, plasma sanguíneo, leche de un animal transgénico, una planta recombinante y una célula recombinante.

3. Método según la reivindicación 1, que comprende además aplicar la butirilcolinesterasa eluida del material de intercambio aniónico al material de purificación por afinidad.

4. Método según la reivindicación 3, en el que el material de purificación por afinidad se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal y procainamida.

5. Método según la reivindicación 1, en el que la fuente biológica se filtra antes de su aplicación al material de intercambio aniónico.

6. Método según la reivindicación 5, en el que la fuente biológica es fracción IV de Cohn, en el que la fracción IV de Cohn se pone en contacto con un compuesto de sílice de combustión, el pH se ajusta a 4,0-4,5, y la fracción IV de Cohn se filtra a través de un medio de filtro.

7. Método según la reivindicación 1, en el que la fuente biológica se somete a tratamiento con disolvente-detergente.

8. Método según la reivindicación 1, en el que la proteína total aplicada a la membrana de intercambio aniónico es de al menos 1000 mg por ml de volumen de membrana.

9. Método según la reivindicación 1, en el que la proteína total aplicada a la membrana de intercambio aniónico es de al menos 2000 mg por ml de volumen de membrana.

10. Método según la reivindicación 1, en el que la membrana está en una serie de dos o más membranas.

11. Método según la reivindicación 1, en el que el grupo de intercambio aniónico funcional unido al material de intercambio aniónico es amina cuaternaria (Q).

12. Método según la reivindicación 1, en el que el método se aplica a la producción a gran escala de butirilcolinesterasa.

13. Método según la reivindicación 1, en el que:

(a) la composición de butirilcolinesterasa se enriquece al menos 20 veces por proteína total en la composición tal como se mide mediante la actividad butirilcolinesterasa por proteína total; o

(b) la composición de butirilcolinesterasa se enriquece al menos 40 veces por proteína total en la composición tal como se mide mediante la actividad butirilcolinesterasa por proteína total; o

(c) la composición de butirilcolinesterasa se enriquece al menos 60 veces por proteína total en la composición tal como se mide mediante la actividad butirilcolinesterasa por proteína total; o

(d) la velocidad de flujo para la etapa de aplicación es de al menos 1,5 veces el volumen de membrana por minuto; o

(e) la conductividad del material de la fuente biológica cargado sobre la membrana es de 2,8 mS/cm o menos; o

(f) al menos dos membranas Q se conectan en serie; o

(g) la conductividad del tampón de lavado en la etapa de lavado es de 3,8 mS/cm o menos; o

(h) la conductividad del tampón de elución en la etapa de elución es de al menos 5,6 mS/cm.

FIG 1

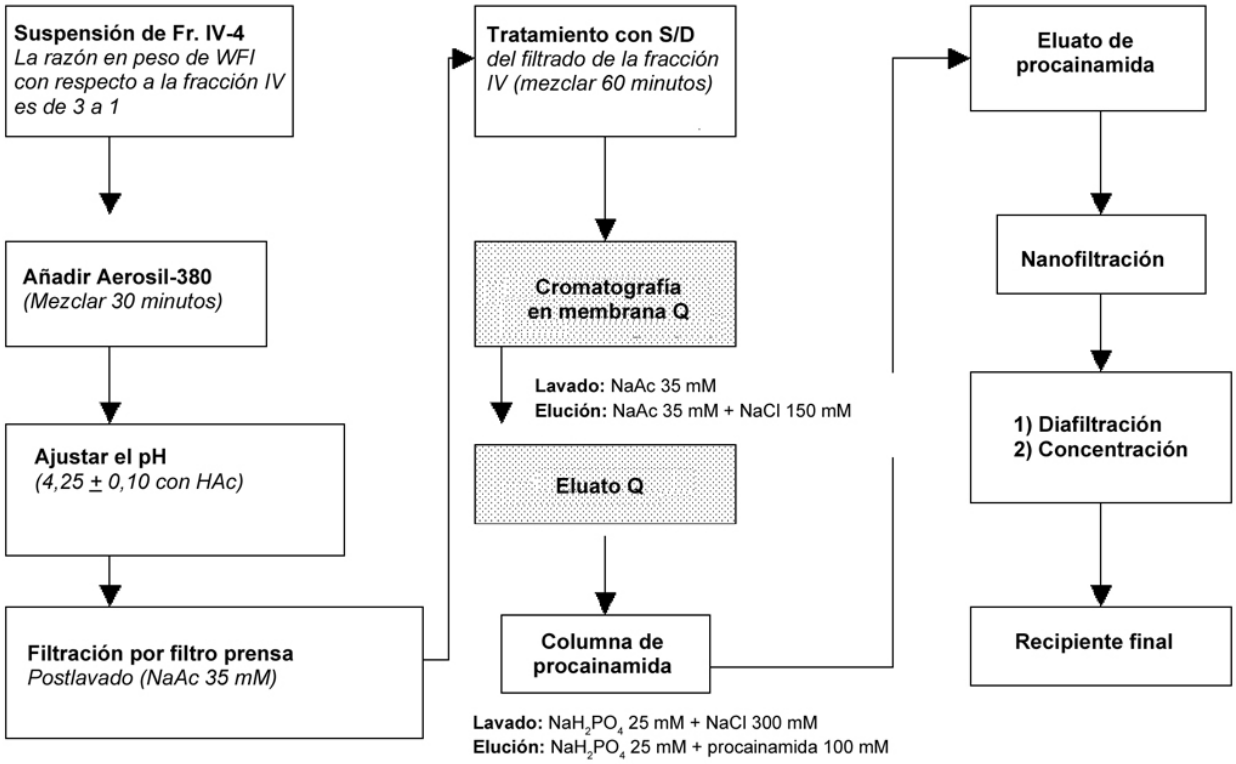

Suspensión de Fr. IV-4
La razón en peso de WFI con respecto a la fracción IV es de 3 a 1
Añadir Aerosil-380
(Mezclar 30 minutos)
Ajustar el pH
(4,25 ± 0,10 con HAc)
Filtración por filtro prensa
Postlavado (NaAc 35 mM)
Tratamiento con S/D
del filtrado de la fracción IV (mezclar 60 minutos)
Cromatografía en membrana Q
Lavado: NaAc 35 mM
Elución: NaAc 35 mM + NaCl 150 mM
Eluato Q
Columna de procainamida
Lavado: NaH2PO4 25 mM + NaCl 300 mM
Elución: NaH2PO4 25 mM + procainamida 100 mM
Eluato de procainamida
Nanofiltración
1) Diafiltración
2) Concentración
Recipiente final

FIG 2

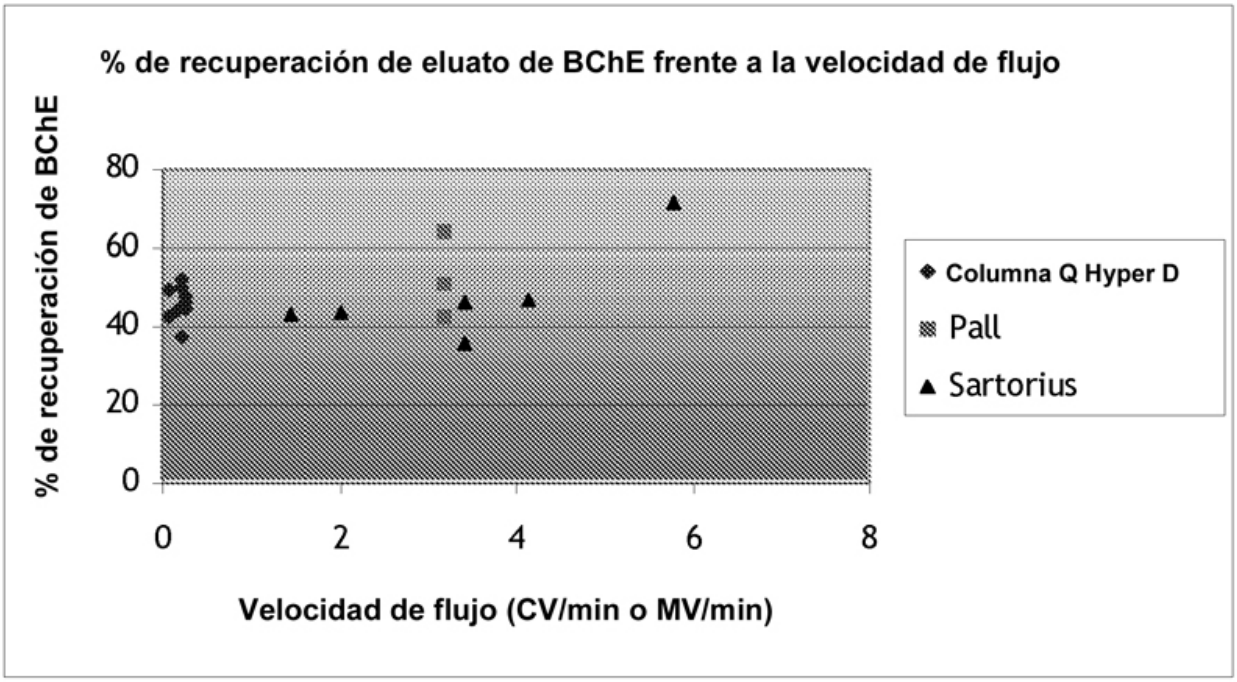

% de recuperación de eluato de BChE frente a la velocidad de flujo
% de recuperación de BChE
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
Velocidad de flujo (CV/min o MV/min)
Columna Q Hyper D
Pall
Sartorius

FIG 3

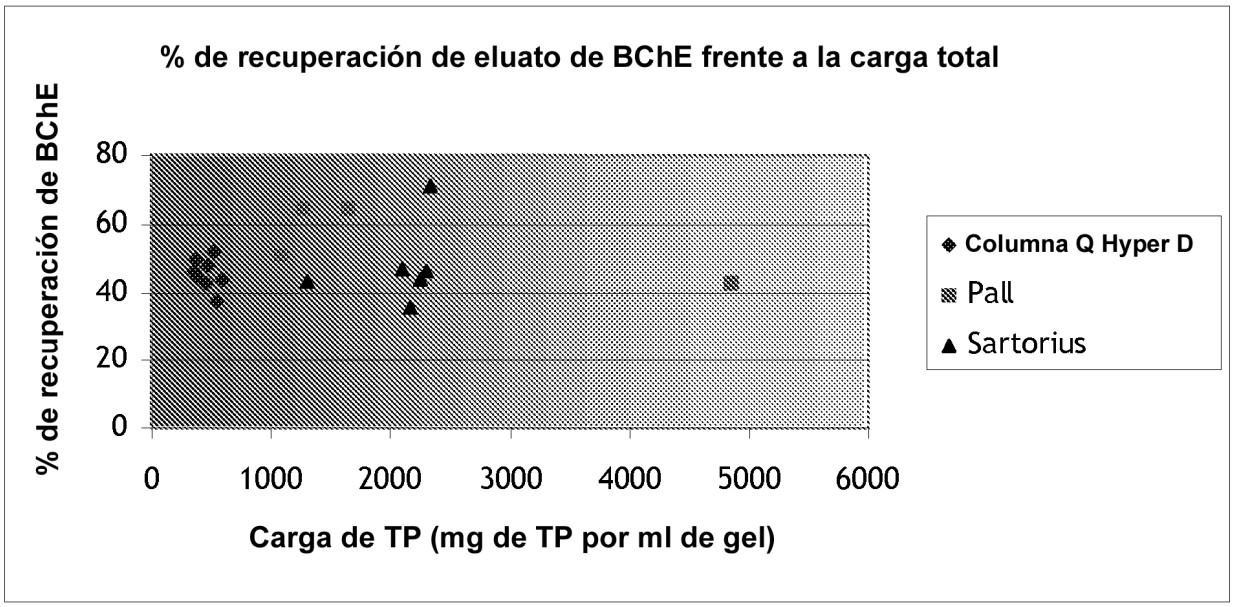

% de recuperación de eluato de BChE frente a la carga total
% de recuperación de BChE
80
60
40
20
0
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
Carga de TP (mg de TP por ml de gel)
Columna Q Hyper D
Pall
Sartorius

FIG 4

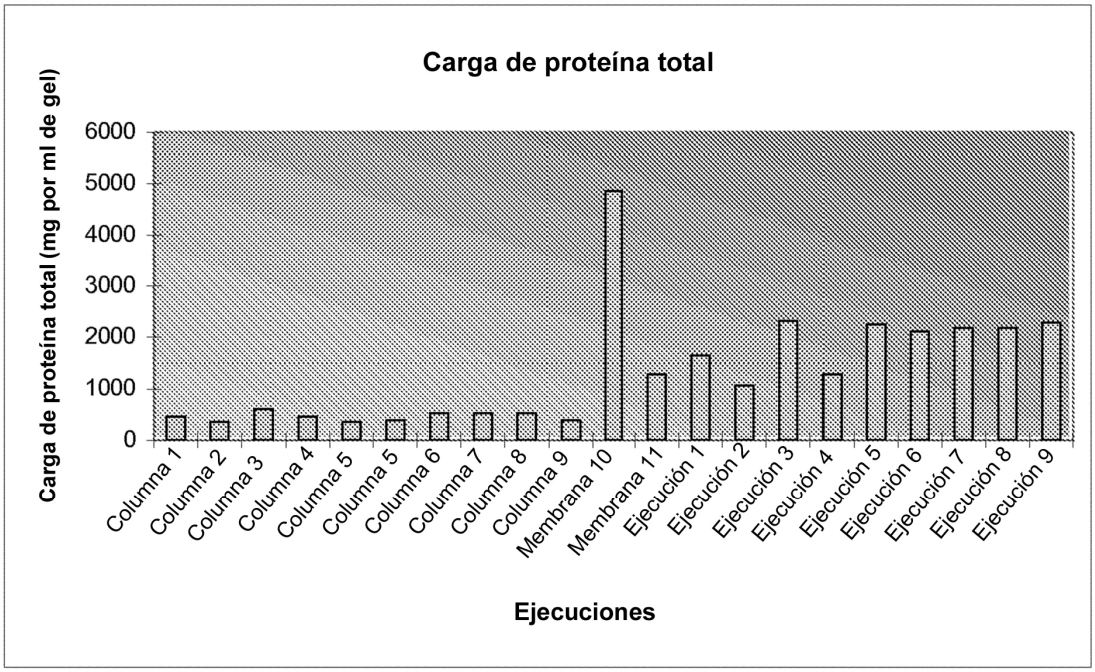

Carga de proteína total
Carga de proteína total (mg por ml de gel)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Columna 1
Columna 2
Columna 3
Columna 4
Columna 5
Columna 5
Columna 6
Columna 7
Columna 8
Columna 9
Membrana 10
Membrana 11
Ejecución 1
Ejecución 2
Ejecución 3
Ejecución 4
Ejecución 5
Ejecución 6
Ejecución 7
Ejecución 8
Ejecución 9
Ejecuciones

FIG 5

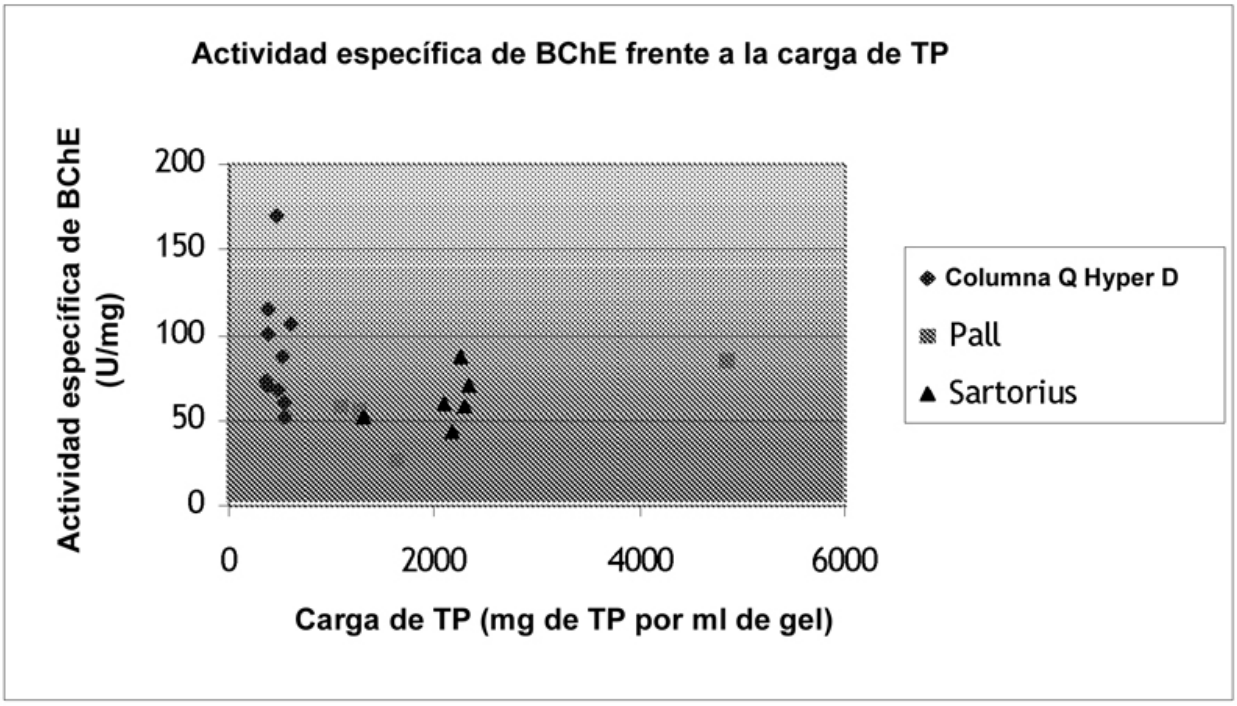

Actividad específica de BChE frente a la carga de TP
Actividad específica de BChE (U/mg)
200
150
100
50
0
0
2000
4000
6000
Carga de TP (mg de TP por ml de gel)
Columna Q Hyper D
Pall
Sartorius

FIG 6

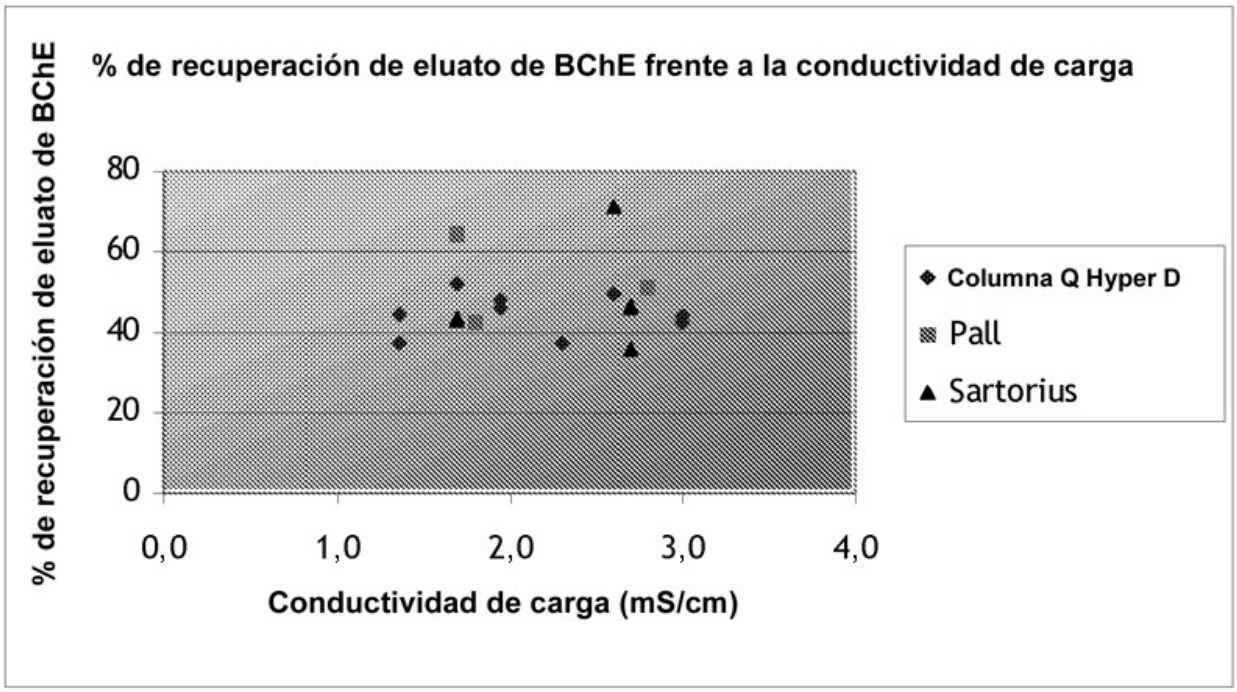
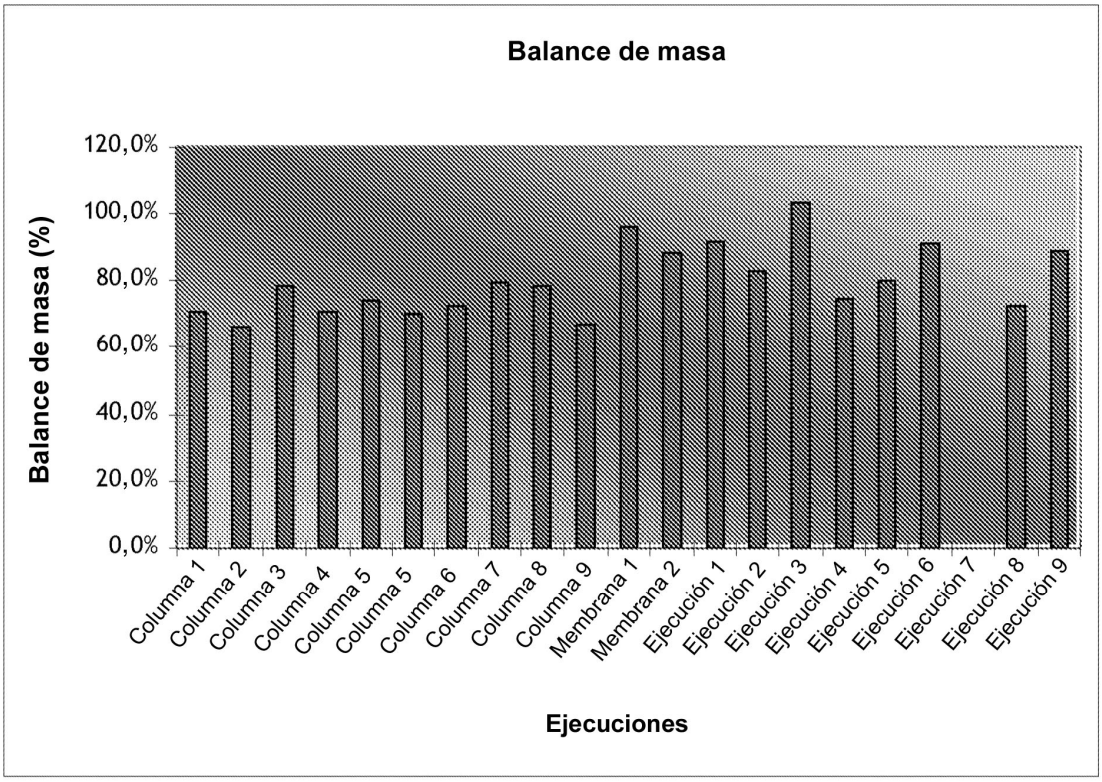

% de recuperación de eluato de BChE frente a la conductividad de carga
% de recuperación de eluato de BChE
80
60
40
20
0
0,0
1,0
2,0
3,0
4,0
Conductividad de carga (mS/cm)
Columna Q Hyper D
Pall
Sartorius

FIG 7


Balance de masa
Balance de masa (%)
120,0%
100,0%
80,0%
60,0%
40,0%
20,0%
0,0%
Columna 1
Columna 2
Columna 3
Columna 4
Columna 5
Columna 5
Columna 6
Columna 7
Columna 8
Columna 9
Membrana 1
Membrana 2
Ejecución 1
Ejecución 2
Ejecución 3
Ejecución 4
Ejecución 5
Ejecución 6
Ejecución 7
Ejecución 8
Ejecución 9
Ejecuciones