

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 205**

51 Int. Cl.:

C07K 14/765 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2013 PCT/AU2013/000836**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014 WO14015388**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2013 E 13823892 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2877484**

54 Título: **Un método para refinar albúmina**

30 Prioridad:

27.07.2012 US 201261676799 P

23.08.2012 EP 12181515

14.03.2013 US 201313826500

11.04.2013 AU 2013203968

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

19.02.2018

73 Titular/es:

CSL LIMITED (100.0%)

45 Poplar Road

Parkville VIC 3052, AU

72 Inventor/es:

MCCANN, KARL BEAUMONT y

BERTOLINI, JOSEPH

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 655 205 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

Un método para refinar albúmina

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere, por lo general, a un método para purificar albúmina a partir de una disolución. Más concretamente, a un método para refinar una disolución enriquecida en albúmina a través de una resina cromatográfica de inducción de carga hidrófoba.

ANTECEDENTES

10 La mayor parte de la seroalbúmina humana comercial (HSA, por sus siglas en inglés) se fabrica utilizando métodos de precipitación con etanol basados en los desarrollados originalmente por Cohn *et al.* [1946] y las posteriores modificaciones de Kistler y Nitschmann [1962]. La separación utilizando estos métodos se basa en la solubilidad de las proteínas plasmáticas con distintas concentraciones de etanol, pH, fuerza iónica y temperatura. Sin embargo, un inconveniente principal del proceso de purificación de Cohn para la purificación de albúmina es el uso de concentraciones de etanol de hasta un 40% v/v y el requisito de que los procedimientos se lleven a cabo a temperaturas inferiores a 0 °C. No obstante, el éxito continuado de la purificación de albúmina mediante precipitación con etanol se atribuye en gran parte al hecho de que estos métodos son muy eficaces para procesar los grandes volúmenes que se encuentran en un proceso de fraccionamiento del plasma moderno.

15 Actualmente se están fraccionando cantidades de albúmina menores, pero en aumento, utilizando procesos cromatográficos como paso de refinado final tras el fraccionamiento con etanol inicial [More y Harvey, 1991] o como proceso cromatográfico completamente integrado [Marrs, 1993; Yap *et al.*, 1993; Martins *et al.*, 2011; Berglof *et al.*, 1983]. La purificación cromatográfica de HSA posee varias ventajas que incluyen rendimientos superiores, pureza superior [More y Harvey, 1991; Yap *et al.*, 1993; Véron *et al.*, 1993], agregados menores y una tolerabilidad y seguridad clínica mejoradas [Che *et al.*, 2006]. El método cromatográfico desarrollado originalmente por Berglof *et al.* [1983], por ejemplo, se aplicó inicialmente a una corriente de alimentación del Sobrenadante II + III e incluye el uso de dos columnas de exclusión por tamaño e intercambio iónico. Este método se adaptó más adelante a una corriente de alimentación del Sobrenadante I deslipidado para incorporar el proceso cromatográfico con un elevado rendimiento de IgG para Intragam P [Yap *et al.*, 1993; Bertolini *et al.*, 1999].

20 A pesar de estas ventajas, la incorporación generalizada de los procesos cromatográficos para el fraccionamiento de la albúmina humana se ha visto limitada a causa de las ineficacias asociadas con el funcionamiento de estos procesos a escala industrial. Además, los pasos de cromatografía de intercambio aniónico y catiónico utilizados en métodos tales como los presentados por Berglof *et al.* [1983] conllevan la captura/unión de la albúmina a la resina. La unión positiva de la albúmina a las columnas de intercambio catiónico y aniónico implica que las cargas proteicas se restringen a cantidades ≤ 100 g/L. Esto ha limitado la aplicación industrial, puesto que el plasma humano contiene albúmina como proteína predominante (aprox. un 60–70% de la proteína total) y la purificación cromatográfica de la albúmina requeriría, por lo tanto, columnas grandes (≥ 200 L) y ciclos múltiples. Esto es particularmente evidente en el caso de los procesos completamente cromatográficos, que emplean un paso de filtración en gel para el refinado final de la HSA con el fin de eliminar las proteínas impurificantes de elevado peso molecular. Las tasas de flujo bajas y las cargas de muestra pequeñas que se requieren para mantener una separación eficaz convierten este paso en un cuello de botella importante en el proceso de fabricación de albúmina cromatográfica.

35 La presente invención soluciona, o al menos mitiga parcialmente, los problemas en la técnica proporcionando un método más eficaz para refinar una disolución enriquecida en albúmina.

COMPENDIO DE LA INVENCION

40 En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para refinar albúmina con el fin de eliminar contaminantes que comprende hacer pasar una disolución enriquecida en albúmina a través de una resina cromatográfica de inducción de carga hidrófoba y recuperar la disolución de albúmina que pasa a través de la resina.

45 En una realización, la resina cromatográfica de inducción de carga hidrófoba comprende 4-mercaptoetilpiridina.

En una realización, la disolución enriquecida en albúmina se selecciona a partir de Sobrenadante I de Cohn, Sobrenadante II + III de Cohn, Sobrenadante o Filtrado de Kistler-Nitschmann, Sobrenadante IV de Cohn y Fracción V de Cohn. En una realización, la disolución enriquecida en albúmina es un Sobrenadante I de Cohn diafiltrado. En una realización, al Sobrenadante o Filtrado de Kistler-Nitschmann Nitschmann es Sobrenadante/Filtrado A o B.

50 En una realización, la disolución enriquecida en albúmina es una disolución no retenida recuperada cuando se hace pasar plasma o Sobrenadante I de Cohn diafiltrado a través de una resina de adsorción de lecho expandido en modo negativo respecto a la albúmina.

En una realización, la disolución enriquecida en albúmina está deslipidada y desprovista de euglobina.

5 En una realización, antes de hacer pasar la disolución enriquecida en albúmina a través de la resina cromatográfica de inducción de carga hidrófoba, el método comprende los pasos de (a) hacer pasar la disolución a través de una resina de intercambio aniónico en modo negativo respecto a la albúmina y (b) hacer pasar la disolución a través de una resina de intercambio catiónico en modo negativo respecto a la albúmina. En una realización, el método comprende hacer pasar la fracción no retenida procedente de la resina de intercambio aniónico del paso (a) a través de la resina de intercambio catiónico del paso (b). En otra realización, el método comprende hacer pasar la fracción no retenida procedente de la resina de intercambio catiónico del paso (b) a través de la resina de intercambio aniónico del paso (a).

10 En una realización, el método comprende pasteurizar la disolución de albúmina refinada.

En la presente también se describe una disolución de albúmina refinada recuperada con los métodos descritos en la presente.

En la presente también se describe una disolución de albúmina pasteurizada producida con los métodos descritos en la presente.

15 Además, en la presente se describe una composición que comprende una disolución de albúmina refinada y que tiene una turbidez inferior a 5 NTU. En un ejemplo, la composición comprende:

- 20 (a) una concentración de sodio superior a 80 mM;
 (b) un porcentaje de albúmina superior a un 19% p/v;
 (c) una concentración de IgA inferior a 4 µg/mL;
 (d) una concentración de IgG inferior a 0.1 mg/mL;
 (e) una concentración de Apolipoproteína A1 inferior a 0.03 mg/mL;
 (f) una concentración de inhibidor de α1-proteinasa inferior a 0.07 mg/mL y/o
 (g) un porcentaje de agregados/polímeros inferior a un 1% p/v.

25 Además, en la presente se describe una disolución de albúmina refinada que comprende al menos un 19% p/v de proteína total y uno o más cualesquiera de los siguientes:

- 30 (a) un contenido de albúmina de al menos un 95% de la proteína total;
 (b) un porcentaje de agregados inferior a un 2% p/v, preferentemente un porcentaje de agregados inferior a un 1% p/v;
 (c) un contenido de dímeros inferior a un 2% p/v, más preferentemente inferior a un 1.5% p/v;
 (d) un contenido de monómeros de al menos un 97% p/v;
 (e) un contenido de fragmentos inferior a un 0.5% p/v;
 (f) una concentración de activador de precalicreína (PKA) inferior a 28.6 UI/mL, más preferentemente una concentración de PKA inferior a 10 UI/mL, incluso más preferentemente una concentración de PKA inferior a 1 UI/mL;
 35 (g) un porcentaje de α₂-macroglobulina inferior a un 0.1% p/v;
 (h) un porcentaje de Apolipoproteína A1 inferior a un 0.01% p/v;
 (i) un porcentaje de transferrina inferior a un 0.05% p/v;
 (j) un porcentaje de α₁-glicoproteína inferior a un 0.05% p/v;
 (k) un porcentaje de inhibidor de α₁-proteinasa inferior a un 0.1% p/v; preferentemente un porcentaje de inhibidor de α₁-proteinasa inferior a un 0.05% p/v;
 40 (l) un porcentaje de haptoglobina inferior a un 0.05% p/v;
 (m) un porcentaje de inhibidor de inter-α-tripsina inferior a un 0.1% p/v;
 (n) una concentración de desde aproximadamente 45 mmol/L hasta aproximadamente 100 mmol/L de sodio, preferentemente de desde aproximadamente 80 mmol/L hasta 90 mmol/L;
 45 (o) una concentración de IgA inferior a 5 µg/mL, preferentemente una concentración de IgA inferior a 2 µg/mL;
 (p) una concentración de IgG inferior a 0.2 mg/mL, preferentemente una concentración de IgG inferior a 0.01 mg/mL;
 (q) una concentración de aluminio inferior a 110 µg/L, una concentración de aluminio inferior a 80 µg/L, más preferentemente una concentración de aluminio inferior a 30 µg/L;
 50 (r) una concentración de caprilato inferior a 40 mmol/L;
 (s) una osmolalidad de aproximadamente 130 mosmol/kg a aproximadamente 140 mosmol/kg y
 (t) una turbidez inferior a 6 NTU, preferentemente inferior a 3 NTU.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

55 La **Figura 1** muestra el perfil de penetración de impurezas para la α₂-macroglobulina durante la purificación con MEP Hypercel del eluato de CM con el pH ajustado. Los resultados muestran la cantidad de impureza (α₂-macroglobulina)

detectada en el flujo no retenido, investigada en un volumen de muestra de hasta 1000 mL.

La **Figura 2** muestra el perfil de penetración de impurezas para la IgG durante la purificación con MEP Hypercel del eluato de CM con el pH ajustado. Los resultados muestran la cantidad de impureza (IgG) detectada en el flujo no retenido, investigada en un volumen de muestra de hasta 1000 mL.

- 5 La **Figura 3** muestra el perfil de penetración de impurezas para la IgA durante la purificación con MEP Hypercel del eluato de CM con el pH ajustado. Los resultados muestran la cantidad de impureza (IgA) detectada en el flujo no retenido, investigada en un volumen de muestra de hasta 1000 mL.

- 10 La **Figura 4** muestra el perfil de penetración de impurezas para la IgM durante la purificación con MEP Hypercel del eluato de CM con el pH ajustado. Los resultados muestran la cantidad de impureza (IgM) detectada en el flujo no retenido, investigada en un volumen de muestra de hasta 1000 mL.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 15 A lo largo de toda esta memoria descriptiva, a menos que el contexto indique lo contrario, se sobreentenderá que la palabra “comprender” o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, implica la inclusión de un elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros determinado, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

La referencia en esta memoria descriptiva a cualquier publicación (o información derivada de ella) anterior o a cualquier contenido que sea conocido no es ni se debería considerar como un reconocimiento o admisión o cualquier forma de sugerencia de que esa publicación (o información derivada de ella) anterior o contenido conocido forme parte del conocimiento general común en el campo de aplicación al que se refiere esta memoria descriptiva.

- 20 Cabe señalar que, tal como se utiliza en la memoria descriptiva en cuestión, las formas en singular “un”, “uno/a” y “el/la” incluyen los aspectos plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “una resina” incluye una única resina, así como dos o más resinas; la referencia a “la composición” incluye una única composición, así como dos o más composiciones y así sucesivamente.

- 25 En ausencia de cualquier indicación de lo contrario, se debe considerar que una referencia hecha a un contenido de un “%” a lo largo de esta memoria descriptiva se refiere a un % p/v (peso/volumen).

- 30 La albúmina y la IgG son dos de los productos más importantes comercialmente extraídos del plasma. Mediante el proceso de Cohn, en condiciones específicas de concentraciones de etanol, temperatura, conductividad y pH, se genera una fracción intermedia (Sobrenadante I) que está enriquecida en IgG y albúmina. A continuación, se generan la Fracción II + III y el Sobrenadante II + III, que están enriquecidos en IgG y albúmina, respectivamente. Más adelante se logra una purificación adicional manipulando los parámetros anteriores. Sin embargo, una desventaja principal del proceso de purificación de Cohn es el uso de etanol y el requisito de que los procedimientos se lleven a cabo a temperaturas inferiores a 0 °C. La purificación de la albúmina en particular requiere concentraciones elevadas de etanol (hasta un 40% p/v para las Fracciones IV y V de Cohn).

- 35 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que hacer pasar una disolución enriquecida en albúmina a través de una resina cromatográfica de inducción de carga hidrófoba en modo negativo respecto a la albúmina y recuperar la disolución de albúmina que pasa a través de la resina es una alternativa eficaz a los procesos cromatográficos existentes para refinar (purificar) la albúmina en disolución, con lo que la disolución de albúmina refinada resultante tiene una pureza mayor que la disponible utilizando los procesos cromatográficos existentes. También se ha descubierto que combinando un paso cromatográfico de intercambio iónico anterior al refinado mediante una resina cromatográfica de inducción de carga hidrófoba, el método de la presente invención puede proporcionar una disolución de albúmina con un nivel de pureza incluso superior que los procesos existentes. Cuando se combina con el hecho de que estos pasos de cromatografía se pueden incorporar a procesos industriales posteriores existentes para la purificación de albúmina, esta ofrece a la industria de fraccionamiento del plasma una técnica de separación eficaz que complementa los demás pasos de fraccionamiento.

- 45 En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para refinar albúmina con el fin de eliminar contaminantes de alto peso molecular que comprende hacer pasar una disolución enriquecida en albúmina a través de una resina cromatográfica de inducción de carga hidrófoba y recuperar la disolución de albúmina que pasa a través de la resina.

- 50 Los expertos en la técnica estarían familiarizados con los métodos para fraccionar los productos derivados de la sangre, tales como la albúmina, de las impurezas (p. ej., impurezas de alto peso molecular tales como la inmunoglobulina) utilizando una cromatografía. La mayoría de los procesos cromatográficos emplean un soporte sólido, también denominado indistintamente en la presente resina o matriz. Los expertos en la técnica estarían familiarizados con los soportes sólidos adecuados y la elección dependerá invariablemente del tipo de producto que se ha de purificar. Algunos ejemplos de soportes sólidos adecuados incluyen portadores inorgánicos, tales como

vidrio y gel de sílice, portadores orgánicos naturales o sintéticos tales como agarosa, celulosa, dextrano, poliamida, poliacrilamidas, copolímeros vinílicos de acrilatos bifuncionales y varios monómeros hidroxilados, y similares. Los portadores que se pueden adquirir de proveedores comerciales se venden con los nombres de resinas Sephadex™, Sepharose™, Hypercel™, Capto™, Fractogel™, MacroPrep™, Unosphere™, GigaCap™, Trisacryl™, Ultrogel™, Dynospheres™, Macrosorb™ y XAD™.

Los pasos de cromatografía generalmente se llevarán a cabo en condiciones no desnaturalizantes y a temperaturas convenientes en el intervalo de aproximadamente -10 °C a +30 °C, más habitualmente a aproximadamente temperaturas ambiente. Los pasos cromatográficos se pueden llevar a cabo por lotes o de forma continua, según convenga. Se puede emplear cualquier método de separación conveniente tal como centrifugación, filtración, decantación o similares.

Los expertos en la técnica estarán familiarizados con la cromatografía de inducción de carga hidrófoba (HCIC, por sus siglas en inglés). La HCIC utiliza restos de unión anclados a un soporte sólido, donde los restos de unión tienen especificidad por el analito que, de acuerdo con los métodos de la presente invención, son impurezas de alto peso molecular (p. ej., inmunoglobulina). La HCIC difiere de otros tipos de cromatografía de afinidad tales como la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés), la cual ofrece selectividad para separar proteínas del plasma en función de las diferencias de hidrofobicidad superficial de las proteínas [Goheen y Matson, 1985; Ramos-Clamont *et al.*, 2006]. La selectividad proporcionada por la HIC ha hecho posible que se utilice con éxito para la purificación de albúmina a partir de plasma humano [Rucheton *et al.*, 1997], placenta humana [Cabrera-Crespo *et al.*, 2000] y para la HSA recombinante procedente de *Pichia pastoris* [Ohmura *et al.*, 1995]. Sin embargo, a pesar de que la HIC ofrece un modo de separación ortogonal a los pasos de intercambio iónico utilizados para la purificación cromatográfica de la albúmina, estas matrices o resinas no son utilizadas por ninguno de los fraccionadores de plasma comerciales. Un factor contribuyente que limita la incorporación de la HIC a gran escala es el hecho de que estos métodos requieren el uso de cantidades importantes de sales liotrópicas con el fin de lograr las condiciones de separación apropiadas [Burton y Harding, 1998]. Algunas aplicaciones requieren el uso de estas sales con concentraciones elevadas para el tampón de equilibrado y la muestra con el fin de que se consiga la separación deseada. Además, la presencia de concentraciones elevadas de sal en la fracción de albúmina requiere una diálisis/diafiltración extensiva antes de los varios pasos de inactivación viral y formulación final.

Se puede utilizar cualquier resina HCIC adecuada conocida por los expertos en la técnica. En una realización, la resina cromatográfica de inducción de carga hidrófoba comprende 4-mercaptoetilpiridina (MEP) (p. ej., MEP Hypercel). El ligando MEP presenta una ventaja en que permite una separación basada en la hidrofobicidad superficial de las proteínas, pero no requiere la adición de sales liotrópicas que a menudo se observa en otros procesos para la purificación de albúmina [Burton y Harding, 1998; Schwartz *et al.*, 2001]. Se ha demostrado que la MEP Hypercel posee una elevada selectividad por las inmunoglobulinas y, por este motivo, ha habido una focalización principal en el uso de este medio para el aislamiento de anticuerpos monoclonales [Schwartz *et al.*, 2001; Ghose *et al.*, 2006; Arakawa *et al.*, 2010; Pezzini *et al.*, 2011]. Además, se ha probado que la MEP Hypercel es eficaz para la separación de penicilina-acilasa [Coulon *et al.*, 2004] y proteínas de fusión Fc [Arakawa *et al.*, 2009].

A diferencia de la cromatografía de interacción hidrófoba tradicional, la HCIC se controla atendiendo al pH, en lugar de la concentración de sales.

La resina MEP Hypercel se compone de una matriz de celulosa a la que se le une 4-mercaptoetilpiridina (4-MEP). La microesfera de celulosa confiere una elevada porosidad, estabilidad química y escasa interacción inespecífica. El tamaño de la microesfera de MEP Hypercel es de aproximadamente 80-100 µm para permitir un buen compromiso entre propiedades de flujo y capacidad. La MEP también exhibe una selectividad y capacidad elevadas para las impurezas de inmunoglobulina de alto peso molecular y tiene un pKa de aproximadamente 4.8. Contiene una cola hidrófoba y una cabeza ionizable. A pH fisiológico, el anillo de piridina aromático no está cargado y es hidrofóbico. El brazo espaciador alifático proporciona contribuciones adicionales a la unión. La unión a inmunoglobulina, por ejemplo, se potencia adicionalmente mediante la interacción con el otro grupo. Tanto la estructura del ligando como la densidad del ligando están diseñadas para proporcionar una unión eficaz en ausencia de sales liotrópicas o de otro tipo. Cuando el pH de la fase móvil se ajusta a valores inferiores a 4.8 (típicamente pH 4.0), el ligando adopta una carga positiva distinta. En tales condiciones, las inmunoglobulinas también portan una carga positiva. Se induce una repulsión electrostática y se desorben las inmunoglobulinas. El comportamiento dependiente del pH del ligando MEP ionizable confiere una propiedad de modo dual, que permite que las proteínas interaccionen mediante interacciones hidrófobas y que la elución tenga lugar mediante repulsión electrostática. Los medios de interacción hidrófoba tradicionales se basan en grupos alquilo que son no ionizables.

Por lo tanto, se puede utilizar la MEP Hypercel como paso de refinado en la fabricación de albúmina. El método se puede aplicar al refinado de albúmina purificada inicialmente mediante cromatografía de intercambio iónico. Por lo tanto, se pueden fabricar lotes a escala de laboratorio integrados utilizando MEP Hypercel, con lo que la albúmina resultante tiene una pureza mayor que en los procesos existentes que utilizan resinas tales como la Sephacryl

S200HR.

La resina MEP Hypercel proporciona una capacidad de unión elevada y tasas de flujo elevadas, ideales para las aplicaciones de purificación de anticuerpos a pequeña y gran escala.

5 En una realización, disolución enriquecida en albúmina se selecciona entre Sobrenadante I de Cohn, Sobrenadante II + III de Cohn, Sobrenadante/Filtrado A, Fracción V y Sobrenadante IV de Cohn. En una realización, la disolución enriquecida en albúmina es un Sobrenadante I de Cohn diafiltrado.

Por lo tanto, en una realización, la disolución enriquecida en albúmina es una disolución no retenida recuperada cuando se hace pasar plasma o Sobrenadante I de Cohn diafiltrado a través de una resina de adsorción de lecho expandido en modo negativo respecto a la albúmina.

10 En una realización, la disolución enriquecida en albúmina está deslipidada y desprovista de euglobulina.

La expresión “disolución enriquecida en albúmina”, tal como se utiliza en la presente, se utiliza indistintamente con expresiones tales como “fracción de albúmina cruda” para designar una disolución que comprende albúmina e impurezas de alto peso molecular tales como inmunoglobulinas.

15 En una realización, antes de hacer pasar la disolución enriquecida en albúmina a través de la resina cromatográfica de inducción de carga hidrófoba, el método comprende los pasos de (a) hacer pasar la disolución a través de una resina de intercambio aniónico en modo negativo respecto a la albúmina y (b) hacer pasar la disolución a través de una resina de intercambio catiónico en modo negativo respecto a la albúmina.

20 Los expertos en la técnica estarían familiarizados con la cromatografía de intercambio iónico (intercambio aniónico o catiónico) y representa uno de los métodos más comunes para la purificación de proteínas y otras moléculas cargadas a partir de una disolución. En la cromatografía de intercambio *catiónico*, las moléculas cargadas positivamente son atraídas hacia un soporte sólido cargado negativamente. En cambio, en la cromatografía de intercambio *aniónico*, las moléculas cargadas negativamente son atraídas hacia un soporte sólido cargado positivamente.

25 Un soporte sólido cargado negativamente (tal como se utiliza en la cromatografía de intercambio catiónico) y un soporte sólido cargado positivamente (tal como se utiliza en la cromatografía de intercambio aniónico) se puede preparar con cualquier medio conocido por los expertos en la técnica y normalmente conlleva la unión covalente de un grupo funcional cargado al soporte sólido. Los expertos en la técnica estarían familiarizados con los grupos funcionales cargados adecuados y el tipo de grupo funcional que se emplee dependerá invariablemente de la molécula que se ha de separar de la disolución. Los ejemplos de resinas de intercambio catiónico adecuadas son las
30 que comprenden un grupo funcional sulfónico (S o SP) o un grupo funcional carboximetilo (CM). Los ejemplos de resinas de intercambio aniónico adecuadas son las que comprenden un grupo funcional amina cuaternaria (Q) y/o un grupo amina terciaria (DEAE) o un grupo dietilaminopropilo (ANX). En una realización de la presente invención, la matriz de intercambio aniónico comprende dietilaminoetanol unido covalentemente a un polímero de polisacárido. En una realización de la presente invención, la matriz de intercambio catiónico comprende grupos carboximetilo unidos
35 covalentemente a un polímero de polisacárido.

En una realización de la presente invención, las condiciones para llevar a cabo el paso de cromatografía de intercambio iónico favorecerán la eliminación de impurezas de la disolución de albúmina tales como inmunoglobulinas (p. ej., IgG, IgA e IgM).

40 Para optimizar la unión de las impurezas cargadas en la disolución enriquecida en albúmina a los grupos funcionales con carga opuesta anclados al soporte sólido, la disolución de albúmina será generalmente de conductividad baja a media (es decir, tendrá una concentración de sales de baja a media). La adsorción de las impurezas cargadas en la disolución de albúmina al soporte sólido estará regida por la interacción iónica entre los grupos iónicos con cargas opuestas en las impurezas y en el ligando funcional sobre el soporte. La fuerza de la interacción está determinada por el número y localización de las cargas en las impurezas y en el grupo funcional. Al incrementar la concentración
45 de sales (generalmente utilizando un gradiente de sales lineal), las moléculas con las interacciones iónicas más débiles (es decir, la albúmina) comenzarán a eluir de la columna en primer lugar y a ser recuperadas en la fracción no retenida. Las moléculas que tengan una interacción iónica más fuerte (p. ej., las impurezas tales como las inmunoglobulinas) requieren una concentración de sales superior y eluyen más tarde en el gradiente. Las capacidades de unión de las resinas de intercambio iónico son por lo general bastante elevadas. Esto es de gran
50 importancia en la cromatografía a escala industrial, pero es menos crítico para las aplicaciones a escala analítica.

Los expertos en la técnica comprenderán que los cambios en el pH también pueden afectar a la separación mediante cromatografía de intercambio iónico. En la cromatografía de intercambio catiónico, por ejemplo, aumentar el pH del tampón de la fase móvil provocará que la molécula pase a estar menos protonada y, por tanto, menos cargada positivamente. El resultado es que la proteína ya no puede formar una interacción iónica con el soporte
55 sólido cargado negativamente, lo que en última instancia da como resultado que la molécula eluya de la columna. En

la cromatografía de intercambio aniónico, disminuir el pH del tampón de la fase móvil provocará que la molécula pase a estar más protonada y, por tanto, más cargada positivamente (y menos negativamente). El resultado es que la proteína ya no puede formar una interacción iónica con el soporte sólido cargado positivamente que provoca que la molécula eluya de la columna.

- 5 El pH del tampón de la fase móvil puede estar entre el pI (punto isoeléctrico) o pKa (constante de disociación del ácido) de la molécula cargada y el pKa del grupo cargado en el soporte sólido. Por ejemplo, en la cromatografía de intercambio catiónico, utilizando un grupo funcional en el soporte sólido con un pKa de 1.2, se puede hacer correr una molécula de muestra con un pI de 8.2 en un tampón de fase móvil de pH 6.0. En la cromatografía de intercambio aniónico, se puede hacer correr una molécula con un pI de 6.8 en un tampón de fase móvil a pH 8.0
10 cuando el pKa del soporte sólido sea 10.3.

También se puede aplicar un gradiente de concentración de sales que aumente de forma lineal para eluir los componentes unidos (es decir, impurezas) del soporte sólido después de que se haya recuperado la disolución enriquecida en albúmina, si fuera necesario. Una alternativa a utilizar un gradiente lineal es utilizar un gradiente escalonado. Esto requiere un equipo menos complicado y puede ser muy eficaz para eluir fracciones diferentes si se conocen las concentraciones de sal apropiadas, normalmente a partir de experimentos con gradiente lineal. Los pasos de cromatografía de acuerdo con la presente invención se llevan a cabo en modo negativo respecto a la albúmina, donde las impurezas en la disolución de albúmina de partida son retenidas en el soporte sólido cargado y la albúmina se recupera en la fracción no retenida. Las impurezas (aniones o cationes) son retenidas en la fase estacionaria (es decir, soporte sólido) y se pueden eluir posteriormente, si fuera necesario, aumentando la concentración de una especie cargada de forma similar que desplazará los iones de la impureza de la fase estacionaria. Por ejemplo, en la cromatografía de intercambio catiónico, la impureza cargada positivamente podría desplazarse mediante la adición de iones de sodio cargados positivamente.

La cromatografía se puede llevar a cabo utilizando columnas de flujo axial tales como las que se pueden adquirir de GE Healthcare, Pall Corporation y Bio-Rad o utilizando columnas de flujo radial tales como las que se pueden adquirir de Proxycs. La cromatografía también se puede llevar a cabo utilizando tecnologías de lecho expandido.

El método de la presente invención puede emplear también el uso de múltiples pasos de cromatografía de intercambio iónico para mejorar la purificación de la albúmina. El uso de múltiples pasos de cromatografía de intercambio iónico puede emplear más de una resina de intercambio aniónico o más de una resina de intercambio catiónico. El método también puede emplear múltiples resinas de intercambio aniónico y catiónico (es decir, más de una resina de intercambio aniónico y más de una resina de intercambio catiónico).

Los expertos en la técnica comprenderán que no importa en qué orden se lleven a cabo los múltiples pasos de cromatografía de intercambio iónico de la presente invención. Por tanto, en una realización, la fracción no retenida de la resina de intercambio aniónico del paso (a) se hace pasar a través de la resina de intercambio catiónico del paso (b). En otra realización, la fracción no retenida de la resina de intercambio catiónico del paso (b) se hace pasar a través de la resina de intercambio aniónico del paso (a).

En una realización, donde la disolución enriquecida en albúmina se hace pasar a través de las resinas de intercambio iónico, las fracciones no retenidas enriquecidas en albúmina de los pasos (a) y/o (b) se pueden recoger y almacenar indefinidamente para un fraccionamiento (purificación) posterior de acuerdo con los métodos de la presente invención. En otra realización, la fracción no retenida enriquecida en albúmina recuperada a partir de los pasos (a) y (b) se hace pasar directamente a través de la resina de inducción de carga hidrófoba de acuerdo con los métodos de la presente invención.

Puesto que los pasos de cromatografía de acuerdo con la presente invención se han de llevar a cabo en modo negativo respecto a la albúmina, los expertos en la técnica comprenderían que las condiciones para los pasos cromatográficos de intercambio iónico de acuerdo con la presente invención favorecerán la retención de las impurezas en el soporte sólido, lo que permite que se recupere la albúmina en la fracción no retenida. Dado que la pureza de la albúmina en el plasma es al inicio de aproximadamente un 60-70%, los pasos de cromatografía que unen las proteínas impurificantes menos abundantes son significativamente más eficaces que aquellas que capturan la albúmina. Las cargas proteicas típicas para la captura de albúmina en resinas de intercambio iónico tales como DEAE Sepharose-FF son de 50-65 g/L y de 50-100 g/L para la captura de albúmina en resinas de intercambio iónico tales como CM Sepharose-FF. El uso de cromatografía en modo negativo para los pasos de cromatografía de intercambio aniónico y catiónico puede permitir cargas ≥ 500 g/L.

En una realización de la presente invención, los métodos no comprenden un paso cromatográfico intermedio en modo positivo respecto a la albúmina entre el paso (a) y el paso (b). Sin embargo, los métodos de la presente invención pueden comprender pasos adicionales llevados a cabo en modo positivo respecto a la albúmina, donde esos pasos adicionales no se llevan a cabo entre los pasos cromatográficos de intercambio iónico (a) o (b). Por ejemplo, la resina Capto DEAE se puede utilizar en modo positivo (es decir, para capturar albúmina) con el fin de separar la fracción de IgG cruda en el flujo no retenido, a continuación, eluir la albúmina de la resina Capto DEAE

para una purificación posterior mediante los métodos de acuerdo con la presente invención.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una disolución de albúmina refinada recuperada mediante los métodos descritos en la presente.

5 En una realización, el método comprende además pasteurizar la disolución de albúmina refinada. Se ha descubierto que el resultado de los métodos de la presente invención es una disolución de albúmina refinada que presenta una turbidez inferior cuando se pasteuriza, en comparación con el nivel de turbidez (medida en unidades nefelométricas de turbidez; NTU, por sus siglas en inglés) encontrado en disoluciones de albúmina purificada preparadas mediante los procesos cromatográficos existentes. El nivel de turbidez es una medida de la presencia de impurezas de alto peso molecular en la disolución de albúmina (p. ej., inmunoglobulina). En una realización, la disolución de albúmina
10 pasteurizada tiene una turbidez inferior a 5 NTU.

Además, se proporciona una disolución de albúmina pasteurizada producida mediante los métodos descritos en la presente.

15 La composición o disolución de albúmina refinada proporcionada en la presente comprende al menos un 4% p/v de albúmina purificada. En algunos ejemplos, la composición o disolución de albúmina refinada de la presente invención comprende de un 4% a un 5% p/v de albúmina purificada. En algunos ejemplos, la composición o disolución de albúmina refinada de la presente invención comprende más de un 19% p/v de albúmina purificada. En algunos ejemplos, la composición o disolución de albúmina refinada de la presente invención comprende de un 20% a un 25% p/v de albúmina purificada.

20 En otro ejemplo, se proporciona una composición que comprende una disolución de albúmina pasteurizada y que tiene una turbidez inferior a 5 NTU. En un ejemplo adicional, la composición comprende:

- (a) una concentración de sodio superior a 80 mM;
- (b) un porcentaje de albúmina superior a un 19% p/v;
- (c) una concentración de IgA inferior a 4 µg/mL;
- (d) una concentración de IgG inferior a 0.1 mg/mL;
- 25 (e) una concentración de Apolipoproteína A1 inferior a 0.03 mg/mL;
- (f) una concentración de inhibidor de α -1-proteinasa inferior a 0.07 mg/mL y/o
- (g) un porcentaje de agregados/polímeros inferior a un 1% p/v.

En otro ejemplo, se proporciona una disolución de albúmina refinada que comprende al menos un 19% p/v de proteína total y uno o más cualesquiera de los siguientes:

- 30 (a) un contenido de albúmina de al menos un 95% de la proteína total;
- (b) un porcentaje de agregados inferior a un 2% p/v, preferentemente un porcentaje de agregados inferior a un 1% p/v;
- (c) un contenido de dímeros inferior a un 2% p/v, más preferentemente inferior a un 1.5% p/v;
- (d) un contenido de monómeros de al menos un 97% p/v;
- 35 (e) un contenido de fragmentos inferior a un 0.5% p/v;
- (f) una concentración de activador de precalicreína (PKA) inferior a 28.6 UI/mL, más preferentemente una concentración de PKA inferior a 10 UI/mL, incluso más preferentemente una concentración de PKA inferior a 1 UI/mL;
- (g) un porcentaje de α_2 -macroglobulina inferior a un 0.1% p/v;
- 40 (h) un porcentaje de Apolipoproteína A1 inferior a un 0.01% p/v;
- (i) un porcentaje de transferrina inferior a un 0.05% p/v;
- (j) un porcentaje de α_1 -glicoproteína inferior a un 0.05% p/v;
- (k) un porcentaje de inhibidor de α_1 -proteinasa inferior a un 0.1% p/v; preferentemente un porcentaje de inhibidor de α_1 -proteinasa inferior a un 0.05% p/v;
- 45 (l) un porcentaje de haptoglobina inferior a un 0.05% p/v;
- (m) un porcentaje de inhibidor de inter- α -tripsina inferior a un 0.1% p/v;
- (n) una concentración de desde aproximadamente 45 mmol/L hasta aproximadamente 100 mmol/L de sodio, preferentemente de desde aproximadamente 80 mmol/L hasta 90 mmol/L;
- (o) una concentración de IgA inferior a 5 µg/mL, preferentemente una concentración de IgA inferior a 2 µg/mL;
- 50 (p) una concentración de IgG inferior a 0.2 mg/mL, preferentemente una concentración de IgG inferior a 0.01 mg/mL;
- (q) una concentración de aluminio inferior a 110 µg/L, una concentración de aluminio inferior a 80 µg/L, más preferentemente una concentración de aluminio inferior a 30 µg/L;
- (r) una concentración de caprilato inferior a 40 mmol/L;
- 55 (s) una osmolalidad de aproximadamente 130 mosmol/kg a aproximadamente 140 mosmol/kg y
- (t) una turbidez inferior a 6 NTU, preferentemente inferior a 3 NTU.

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en la presente es susceptible de variaciones y

modificaciones aparte de aquellas descritas de manera específica. Se ha de sobreentender que la invención incluye todas las variaciones y modificaciones de este tipo que entren dentro de la naturaleza. La invención también incluye todos los pasos, características, a las que se hace referencia o se indican en esta memoria descriptiva, de forma individual o colectiva, y todas y cada una de las combinaciones de dos o más cualesquiera de dichos pasos o características.

Ciertas realizaciones de la invención se describirán ahora haciendo referencia a los siguientes ejemplos, los cuales están destinados únicamente a fines ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance de la generalidad descrita anteriormente en la presente.

Ejemplos

10 Materiales y métodos

Disoluciones de proteína: La seroalbúmina humana purificada (HSA) y la inmunoglobulina G humana purificada (IgG) se obtuvieron de CSL Biotherapies (Broadmeadows, Victoria, Australia). Los intermedios del proceso incluido el Sobrenadante I de Cohn (SIN) desprovisto de lípidos y euglobulinas, el eluato de albúmina de la cromatografía con CM Sepharose-FF y la albúmina purificada a partir de la cromatografía con Sephacryl S200HR se obtuvieron de CSL Biotherapies (Broadmeadows, Victoria, Australia). Todas las disoluciones de proteína se filtraron a través de una membrana de 0.22 μm (Durapore[®], Millipore Corporation, Bedford, MA, EE. UU.) antes de la cromatografía.

Anticuerpos y reactivos ELISA: Los anticuerpos contra las proteínas del plasma humano de transferrina, α_2 -macroglobulina, α_1 -glicoproteína, α_1 -antitripsina, inhibidor de inter- α -tripsina, haptoglobina, apolipoproteína A1, apolipoproteína B y ceruloplasmina, que se utilizaron para inmunoelectroforesis, se obtuvieron de The Binding Site (Birmingham, Inglaterra), Siemens Healthcare Diagnostics, Inc. (Nueva York, EE. UU.) y Dako Denmark A/S (Glostrup, Dinamarca). Los kits de ELISA para IgG, IgM, AMG se obtuvieron de Bethyl Laboratories Inc. (Texas, EE. UU.). Los anticuepos e IgA estándar para el ELISA de IgA se obtuvieron de Dako Denmark (Glostrup, Dinamarca). Los anticuerpos contra las proteínas del plasma humano de albúmina, IgG, IgA e IgM, que se utilizaron para análisis de nefelometría, se obtuvieron de Beckman-Coulter Inc. (Fullerton, CA, EE. UU.).

Resinas cromatográficas: La resina MEP Hypercel se obtuvo de Pall Life Sciences (East Hills, NY, EE. UU.). Las resinas DEAE Sepharose-FF, Cpto DEAE, CM Sepharose-FF y Sephacryl S200HR se obtuvieron de GE Healthcare BioSciences AB (Upsala, Suecia).

Ejemplo 1. Caracterización del proceso de Sephacryl S200HR

Antes de comenzar los estudios de desarrollo para la MEP Hypercel, se caracterizó completamente el paso de refinado con Sephacryl S200HR actual para identificar las proteínas contaminantes principales presentes en el intermedio de albúmina y comprender la eficacia de la Sephacryl S200HR para eliminar estos contaminantes. Los intermedios de albúmina antes y después de la cromatografía con Sephacryl S200HR se caracterizaron utilizando nefelometría (sistema de inmunoquímica IMAGE, Beckman-Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE. UU.) para determinar los niveles de albúmina, IgG, IgA e IgM, e inmunoelectroforesis para determinar los niveles de transferrina, α_2 -macroglobulina, α_1 -glicoproteína, α_1 -antitripsina, inhibidor de inter- α -tripsina, haptoglobina, apolipoproteína A1, apolipoproteína B y ceruloplasmina.

El intermedio de albúmina de intercambio iónico concentrado que se carga en la Sephacryl S200HR contenía un 1.42% de proteínas impurificantes, de las cuales α_2 -macroglobulina, IgG e IgA eran las proteínas predominantes (Tabla 1). Estas proteínas impurificantes principales tienen todos los pesos moleculares significativamente superiores al de la albúmina, lo que hace, por tanto, al medio de filtración en gel Sephacryl S200HR muy adecuado para la eliminación de estos contaminantes. El paso de cromatografía con Sephacryl S200HR fue eficaz para eliminar las impurezas de alto peso molecular, con tasas de depuración superiores a un 94% observadas para α_2 -macroglobulina, IgA e IgM, y una depuración de un 74% de IgG. Tras la cromatografía con Sephacryl S200HR el contenido de impurezas total se redujo hasta un 0.19%, siendo la IgG la proteína impurificante presente más abundante.

Tabla 1. Caracterización de la disolución de albúmina antes y después de la cromatografía con Sephacryl S200HR (NE = no examinado).

Componente	Albúmina antes de Sephacryl S200HR		Albúmina después de Sephacryl S200HR		Depuración a través de S200HR (%)
	Concentración (mg/mL)	% del total	Concentración (mg/mL)	% del total	
Albúmina	146.0	-	155.1	-	
IgG	0.544	0.37	0.150	0.096	74.0

Componente	Albúmina antes de Sephacryl S200HR		Albúmina después de Sephacryl S200HR		Depuración a través de S200HR
	Concentración (mg/mL)	% del total	Concentración (mg/mL)	% del total	%
IgA	0.374	0.26	0.012	0.008	97.0
IgM	0.110	0.08	0.007	0.004	94.0
Transferrina	<0.021	-	NE	-	-
α_2 -macroglobulina	0.911	0.62	0.026	0.017	97.3
α_1 -glicoproteína	<0.011	-	NE	-	-
α_1 -antitripsina	0.073	0.05	0.045	0.029	42.0
Inhibidor de inter- α -tripsina	<0.125	-	NE	-	-
Haptoglobina	0.035	0.02	NE	-	-
Apolipoproteína A1	0.034	0.02	0.053	0.034	-46.7
Apolipoproteína B	<0.057	-	NE	-	-
Ceruloplasmina	<0.018	-	NE	-	-
Total		1.42%		0.19%	

Ejemplo 2: Impacto del calentamiento en la turbidez de las disoluciones de albúmina

El historial de seguridad de las disoluciones de albúmina comerciales se atribuye ampliamente al paso de pasteurización (60 °C durante 10 horas) [More y Harvey, 1991]. La disolución de albúmina se estabiliza mediante la adición de caprilato sódico, sin embargo, la presencia de proteínas contaminantes que no están protegidas por el caprilato son susceptibles de desnaturalización inducida por calor durante la pasteurización. Una muestra de control de intermedio de albúmina eluida a partir de una cromatografía con CM Sepharose-FF y muestras intermedias de albúmina purificada procedentes de una cromatografía con Sephacryl S200HR se concentraron hasta un 15-20% p/v de proteína por ultrafiltración (membrana OMEGA de 10 kDa; Pall Life Sciences, EE. UU.) y se formularon con caprilato sódico 32 mM. Estas muestras no se sometieron al paso de incubación con caprilato a pH bajo. Las muestras se pasteurizaron a continuación calentando a 60 °C durante 10 horas. Al completar la pasteurización, se evaluó la turbidez de las muestras utilizando un turbidímetro Hach 2100AN (Hach Company, Loveland, CO, EE. UU.).

A pesar de que el eluato de albúmina procedente de una cromatografía con CM Sepharose-FF tiene una pureza superior a un 98% y, por tanto, cumple con los requisitos de la farmacopea para la composición (y pureza) proteica de la albúmina, la eliminación de las impurezas de alto peso molecular es crítica para la calidad del producto de albúmina final. Esto queda claramente demostrado por el hecho de que cuando se concentra la albúmina procedente de una cromatografía con CM Sepharose-FF, se formula con caprilato sódico y se somete a pasteurización a 60 °C durante 10 horas, se observa un aumento significativo en la turbidez (Tabla 2). No se encuentra aumento de la turbidez cuando se pasteuriza la albúmina purificada procedente de Sephacryl S200HR.

Tabla 2. Efecto de la pasteurización en la turbidez de la albúmina procedente de cromatografía de intercambio iónico y cromatografía con Sephacryl S200

Muestra	Turbidez (NTU)	
	Antes de la pasteurización	Después de la pasteurización
Eluato de Sephacryl S200	2.23	2.36
Eluato de CM Sepharose-FF	2.75	9.36

Ejemplo 3: Determinación de las condiciones de operación de la MEP Hypercel

Los parámetros de operación para la cromatografía con MEP Hypercel se investigaron utilizando muestras purificadas de albúmina e IgG. La unión y elución de albúmina e IgG se determinó por separado utilizando un intervalo de condiciones de equilibrado que incluía; fosfato sódico 50 mM (pH 7.0); acetato sódico 50 mM (pH 5.5);

acetato sódico 50 mM (pH 5.5) + NaCl 150 mM; acetato sódico 50 mM (pH 5.5) + NaCl 300 mM; acetato sódico 50 mM (pH 7.0) y acetato sódico 110 mM (pH 7.0). Las muestras de IgG purificada y albúmina purificada se prepararon en el tampón de equilibrado apropiado con una concentración de aproximadamente 5-10 mg/mL y se filtraron a través de una membrana de 0.22 µm (Durapore®, Millipore Corporation, Bedford, MA, EE. UU.) antes de la cromatografía. Las muestras se cargaron en una columna MEP Hypercel equilibrada (17.5 cm x 1.6 cm de DI; GE Healthcare BioSciences AB, Upsala, Suecia) con 20 g por litro de resina. La proteína no unida se recuperó durante el periodo de carga de la muestra y durante el lavado posterior a la muestra sucesivo utilizando un tampón de equilibrado. La proteína unida se eluyó utilizando tampón de acetato sódico a pH 3.0. Todos los pasos de cromatografía se llevaron a cabo a una tasa de flujo de 100 cm/h y se monitorizaron a 280 nm utilizando un AKTA Explorer 900 equipado con el software Unicorn (GE Healthcare BioSciences AB, Upsala, Suecia). La cantidad de proteína recuperada en las fracciones no retenida y de eluato se determinó utilizando nefelometría.

La condición de tampón de equilibrado más adecuada del experimento mencionado anteriormente se verificó utilizando una muestra que contenía una mezcla 9:1 de albúmina e IgG. La albúmina purificada e IgG purificada se mezclaron en acetato sódico 110 mM (pH 7.0) en una proporción 9:1 para proporcionar una concentración de proteína final de aproximadamente 5-10 mg/mL. La muestra se cargó en la columna MEP Hypercel equilibrada con cargas proteicas de 100, 200 y 300 g/L. La proteína no unida se recuperó utilizando tampón de equilibrado de acetato sódico 110 mM (pH 7.0) y la proteína unida se eluyó utilizando tampón de acetato sódico a pH 3.0. La cantidad de albúmina e IgG en las fracciones no retenida y de eluato se determinó utilizando nefelometría.

Puesto que la muestra de albúmina antes y después de la cromatografía con Sephacryl S200HR contenía IgG como una de las proteínas impurificantes principales, el desarrollo inicial del paso de cromatografía con MEP Hypercel se centró en su capacidad para separar la albúmina de la IgG. La eficacia de la MEP Hypercel para purificar albúmina se evaluó inicialmente monitorizando las características de unión y elución de muestras puras de albúmina humana e IgG humana utilizando tampones de equilibrado de fosfato sódico (pH 7.0) y acetato sódico (pH 5.5). Algunos estudios previos de Schwartz *et al.* [2001] mostraron que la MEP Hypercel tiene una capacidad de unión máxima cuando el pH de la muestra se ajusta a un pH de aproximadamente 7.0. La separación de la albúmina y la IgG utilizando MEP Hypercel también se evaluó a pH 5.5, ya que la albúmina se eluye actualmente de la columna CM Sepharose-FF a pH 5.5 utilizando un tampón de acetato sódico.

El tampón de fosfato sódico a pH 7.0 fue eficaz para unir IgG, con niveles no detectables de IgG recuperados en la fracción no retenida (Tabla 3). En las mismas condiciones, solamente se unieron cantidades menores de albúmina a la MEP Hypercel y se recuperó más de un 85% de la albúmina en la fracción no retenida. El equilibrado de la MEP Hypercel con el tampón de acetato sódico a pH 5.5 dio como resultado unas condiciones donde aproximadamente la mitad de tanto la IgG como la albúmina se unieron a la resina. La adición de cloruro sódico al tampón de acetato sódico (pH 5.5) mejoró la unión de IgG, con niveles no detectables de IgG recuperados en la fracción no retenida (Tabla 3). La adición de cloruro sódico también mejoró la recuperación de albúmina en la fracción no retenida. Sin embargo, a pesar de esta mejora, se recuperó aproximadamente un 15-20% de la albúmina en la fracción de eluato, que fue significativamente superior a la recuperación obtenida cuando se equilibró la MEP Hypercel utilizando el tampón de fosfato sódico a pH 7.0.

Dado que los tampones de acetato sódico se utilizan actualmente en el proceso de la albúmina cromatográfica durante los pasos de cromatografía de intercambio iónico, las características de unión y elución de la albúmina y la IgG purificadas en la resina MEP Hypercel se evaluaron utilizando tampones de acetato sódico a pH 7.0. Ambos tampones de acetato sódico, 50 mM y 100 Mm a pH 7.0, dieron como resultado recuperaciones de IgG y albúmina similares al tampón de fosfato sódico 50 mM, con niveles no detectables de IgG detectados en la fracción no retenida y solamente cantidades menores de albúmina (aproximadamente un 5% del total) detectadas en el eluato (Tabla 3). Los resultados sugieren que el pH del tampón de equilibrado y la muestra puede influir en la unión de las impurezas (p. ej., inmunoglobulinas) a la resina MEP Hypercel, mientras que el tipo de tampón y la conductividad del tampón de equilibrado y la muestra tienen muy poco impacto sobre la separación cuando se trabaja al pH óptimo.

En el proceso de la albúmina cromatográfica actual, la albúmina se eluye de la columna CM Sepharose-FF utilizando un tampón de acetato sódico 110 mM (pH 5.5). Puesto que la MEP Hypercel mostró buena selectividad entre la albúmina y la IgG cuando se equilibró utilizando un tampón de acetato sódico 110 mM a pH 7.0, este tampón se seleccionó para una evaluación adicional. Al seleccionar estas condiciones, implica que la albúmina eluida de la columna CM Sepharose solamente requeriría un paso de ajuste de pH anterior a la carga en la columna MEP Hypercel.

Tabla 3: Porcentaje de recuperación de albúmina e IgG en las fracciones no retenida y de eluato recogidas a partir de la cromatografía con MEP Hypercel utilizando diferentes tampones de equilibrado (ND = no detectable).

Condiciones del tampón	Albúmina		IgG	
	Retenida	Eluato	Retenida	Eluato
Fosfato sódico 50 mM (pH 7.0)	86.9	5.3	ND	63.9

Condiciones del tampón	Albúmina		IgG	
	Retenida	Eluato	Retenida	Eluato
Acetato sódico 50 mM (pH 5.5)	44.7	39.6	42.1	68.1
Acetato sódico 50 mM (pH 5.5) + NaCl 150 mM	79.9	17.3	ND	97.3
Acetato sódico 50 mM (pH 5.5) + NaCl 300 mM	81.1	14.6	ND	90.9
Acetato sódico 50 mM (pH 7.0)	104.5	5.2	ND	96.0
Acetato sódico 110 mM (pH 7.0)	89.2	5.1	ND	90.5

Utilizando las condiciones de equilibrado óptimas determinadas a partir de la Tabla 3, se evaluaron las características de separación de la MEP Hypercel utilizando una mezcla 9:1 de albúmina e IgG. La MEP Hypercel mostró una separación excelente de la mezcla de albúmina e IgG. Con cargas proteicas de hasta 200 g/L, la fracción no retenida contenía niveles no detectables de IgG y más de un 90% de la albúmina total cargada (Tabla 4). La mayor parte de la IgG se recuperó en la fracción de eluato y solamente se perdieron cantidades menores de albúmina en esta fracción. Los resultados sugieren que la MEP Hypercel puede eliminar cantidades significativas de IgG de una disolución de albúmina que tenga una composición similar al eluato de intercambio iónico en el proceso de la albúmina cromatográfica.

Tabla 4: Porcentaje de recuperación de albúmina e IgG en las fracciones no retenida y de eluato recogidas a partir de la cromatografía con MEP Hypercel con cargas proteicas diferentes de una mezcla de albúmina:IgG 9:1 (ND = no detectable)

Carga proteica	Albúmina		IgG	
	No retenida	Eluato	No retenida	Eluato
100 g/L	92.0	1.8	ND	92.1
200 g/L	90.0	1.3	ND	86.9
300 g/L	98.2	0.9	1.4	86.2

Ejemplo 4: Purificación de la albúmina purificada por intercambio iónico utilizando MEP Hypercel

Tras demostrar que la MEP Hypercel podía separar con éxito una mezcla de albúmina e IgG, se evaluó la capacidad de la MEP Hypercel para purificar la albúmina purificada por intercambio iónico. El eluato de albúmina a partir de la cromatografía con CM Sepharose-FF se ajustó a pH 7.0 \pm 0.1 y se clarificó haciéndola pasar a través de un filtro de 0.22 μ m (Durapore®, Millipore Corporation, Bedford, MA, EE. UU.) antes de cargarlo en la columna MEP Hypercel. La muestra de albúmina (1000 mL) se cargó en la columna MEP Hypercel (17.5 cm x 1.6 cm de DI), que se había equilibrado con acetato sódico 110 mM (pH 7.0), a lo que siguió un lavado posterior a la muestra con acetato sódico 110 mM (pH 7.0) para recuperar la proteína no unida y se eliminó la proteína unida lavando con acetato sódico 100 mM (pH 3.0) y NaOH 1 M. La fracción no retenida se recogió en intervalos de 10 mL y se evaluaron los niveles de las proteínas impurificantes principales de IgG, IgA, IgM y α_2 -macroglobulina mediante ELISA.

La MEP Hypercel se evaluó adicionalmente determinando su capacidad para purificar el eluato de albúmina de la columna CM Sepharose-FF. Tal como se ha mostrado previamente en la Tabla 1, la albúmina antes de la cromatografía con Sephacryl S200HR, que contiene la misma composición que el eluato de la columna CM Sepharose-FF, contenía otras proteínas impurificantes que incluían α_2 -macroglobulina, IgA e IgM, además de IgG. Estas cuatro proteínas impurificantes se utilizaron como marcadores de pureza para la evaluación de la MEP Hypercel con el fin de evaluar la selectividad de la MEP Hypercel por las impurezas principales presentes en la albúmina cromatográfica.

El eluato de albúmina con el pH ajustado procedente de la CM Sepharose-FF (1000 mL) se cargó en la columna MEP Hypercel y se recogió la fracción no retenida en intervalos de 10 mL. Los perfiles de penetración de impurezas variaron de forma significativa para las cuatro proteínas impurificantes (Figuras 1-4). Durante las fases iniciales de la carga de muestra solamente se detectaron cantidades menores de IgG en el flujo no retenido (Figura 2). A pesar de un aumento significativo en la penetración de IgG durante las últimas fases de la carga, la concentración máxima de IgG detectada solamente representó un 1.1% de la concentración de IgG en la carga de muestra, lo que sugiere que la MEP Hypercel tiene una selectividad elevada por IgG. El perfil de penetración para IgA siguió un aumento prácticamente lineal a lo largo de toda la carga de muestra (Figura 3). La concentración máxima de IgA detectada en el flujo no retenido representó un 9.3% de la concentración de IgA en la carga de muestra.

Durante las fases iniciales de la carga de muestra solamente se detectaron cantidades menores de IgM en el flujo no retenido (Figura 4). Hacia las fases finales de la carga de muestra se detectó un aumento significativo de IgM en el flujo no retenido. La concentración máxima de IgM detectada en las fases posteriores de la carga de muestra representó un 53.1% de la concentración de IgM de la carga de muestra, lo que sugiere que la capacidad o afinidad de la MEP Hypercel por IgM es significativamente inferior que para IgG e IgA.

Se detectaron cantidades significativas de α_2 -macroglobulina en el flujo no retenido inmediatamente después del comienzo de la carga de muestra en la columna MEP Hypercel (Figura 1). La tasa de incremento en la penetración de la α_2 -macroglobulina fue más rápida que cualquiera de las otras impurezas y, como resultado, la concentración máxima de α_2 -macroglobulina detectada en el flujo no retenido fue de un 76.0% de la α_2 -macroglobulina en la carga de muestra. Puesto que la α_2 -macroglobulina es la proteína impurificante más abundante en el eluato de albúmina procedente de la CM Sepharose-FF y la MEP Hypercel tiene la afinidad más débil por esta proteína, esto indica que la α_2 -macroglobulina será el marcador de impurezas clave para las decisiones posteriores en la cantidad de muestra que se puede cargar en la columna MEP Hypercel.

El análisis inicial de las curvas de penetración de las proteínas impurificantes mostró que las cargas de muestra de hasta 1000 mL en una columna MEP Hypercel de 35 mL eran excesivas. La muestra de albúmina se cargó en la columna MEP Hypercel equilibrada con volúmenes de 100, 200, 300, 400 y 500 mL. El flujo no retenido y el lavado posterior a la muestra se recogió como muestra global junto con el eluato a pH 3.0. Se evaluaron los niveles de albúmina de estas fracciones globales por nefelometría y las proteínas impurificantes principales de IgG, IgA, IgM y α_2 -macroglobulina por ELISA.

La carga de eluato de albúmina con el pH ajustado procedente de CM Sepharose-FF en la columna MEP Hypercel se investigó con volúmenes de muestra entre 100-500 mL. Los datos de recuperación de proteína para las cuatro proteínas impurificantes mostraron tendencias similares a los perfiles de penetración de impurezas mostrados previamente en las Figuras 1-4. La recuperación de IgG en la fracción no retenida fue inferior a un 1% de la IgG total cargada en la carga de muestra más alta (Tabla 5). En las cargas de muestra más altas la recuperación de IgA e IgM también fue relativamente baja con un 1.8% y un 3.6%, respectivamente. Sin embargo, incluso en la carga de muestra más baja de 100 mL, un 5.2% de la α_2 -macroglobulina total cargada en la MEP Hypercel se recuperó en la fracción no retenida. Este aumentó de forma proporcional con la carga de muestra, con un 35.4% de la α_2 -macroglobulina total recuperada en el flujo no retenido para la carga de muestra más alta. Debido a que la α_2 -macroglobulina es la proteína impurificante predominante en la muestra cargada y la MEP Hypercel presenta la afinidad más débil por esta proteína impurificante de todas las impurezas principales, se dedicaron esfuerzos para optimizar la depuración de α_2 -macroglobulina de la MEP Hypercel.

Tabla 5: Porcentaje de recuperación de proteínas en la fracción no retenida procedente de la cromatografía con MEP Hypercel llevada a cabo utilizando cargas de muestra desde 100 hasta 500 mL

Fracción	Componente	Volumen de carga de muestra				
		100 mL	200 mL	300 mL	400 mL	500 mL
No retenida	IgG	0.01	0.03	0.04	0.05	0.06
	IgA	0.3	0.5	1.2	1.6	1.8
	IgM	1.2	1.5	1.8	2.6	3.6
	Albúmina	84.9	71.7	99.6	97.7	98.9
	α_2 -macroglobulina	5.2	8.8	19.8	22.2	35.4

En un intento de mejorar la selectividad de la MEP Hypercel para todas las proteínas impurificantes, el experimento anterior se repitió con NaCl 50 mM añadido al tampón de equilibrado y a la muestra de albúmina. La muestra de albúmina se cargó en la columna MEP Hypercel equilibrada con volúmenes de 100, 200, 300, 400 y 500 mL. El flujo no retenido y el lavado posterior a la muestra se recogió como muestra global junto con el eluato a pH 3.0. Se evaluaron los niveles de albúmina en estas fracciones globales por nefelometría y las proteínas impurificantes principales de IgG, IgA, IgM y α_2 -macroglobulina por ELISA.

Los datos anteriores (Tabla 3) mostraron que la adición de NaCl mejoraba las características de separación de la MEP Hypercel para disoluciones de IgG y albúmina puras. Por lo tanto, se evaluó el impacto de la adición de cloruro sódico 50 mM al tampón de equilibrado y a la muestra de albúmina con el pH ajustado en la eliminación de impurezas de la albúmina. La recuperación de IgG, IgA, IgM y α_2 -macroglobulina en las fracciones no retenidas fue casi idéntica para las separaciones con MEP Hypercel llevadas a cabo con (Tabla 5) y sin la adición de cloruro sódico 50 mM (Tabla 6), lo que indica que la adición de cloruro sódico no tenía ningún impacto en la selectividad de la MEP Hypercel por las proteínas impurificantes en la albúmina.

Tabla 6: Porcentaje de recuperación de proteínas en la fracción no retenida procedente de la cromatografía con MEP Hypercel llevada a cabo utilizando cargas de muestra desde 100 hasta 500 mL después de la adición de NaCl 50 mM a la muestra y al tampón de equilibrado

Fracción	Componente	Volumen de carga de muestra				
		100 mL	200 mL	300 mL	400 mL	500 mL
No retenida	IgG	0.01	0.03	0.05	0.09	0.1
	IgA	0.3	1.2	2.0	1.6	1.7
	IgM	1.7	1.6	2.2	2.9	4.3
	Albúmina	99.2	103.3	113.1	106.8	119.7
	α_2 -macroglobulina	1.6	8.3	12.8	21.0	27.7

5 Ejemplo 5: Evaluación de la tasa de flujo en el rendimiento de la MEP Hypercel

Como parecía que las cuatro proteínas impurificantes principales tenían afinidades diferentes por la resina MEP Hypercel, se llevaron a cabo estudios para investigar el impacto de la tasa de flujo en la unión de las proteínas impurificantes. Utilizando las condiciones cromatográficas anteriores, se cargó la muestra de albúmina (100 mL) en la columna MEP Hypercel con tasas de flujo de 50, 100 y 150 cm/h. Las fracciones no retenida y de eluato se recogieron como muestras globales y se les evaluaron los niveles de albúmina por nefelometría y las proteínas impurificantes principales de IgG, IgA, IgM y α_2 -macroglobulina por ELISA.

El impacto de la tasa de flujo en la separación de las proteínas impurificantes con MEP Hypercel se evaluó entre 50 y 150 cm/h. A 50 cm/h se recuperó menos de un 1% de cada proteína impurificante en la fracción no retenida (Tabla 7). El aumento de la tasa de flujo provocó una penetración mayor de todas las impurezas, pero esta fue más pronunciada para la IgA y la α_2 -macroglobulina.

Tabla 7: Porcentaje de recuperación de proteínas en la fracción no retenida procedente de MEP Hypercel llevada a cabo a tasas de flujo desde 50 hasta 150 cm/h.

Fracción	Componente	Tasa de flujo (cm/h)		
		50	100	150
No retenida	IgG	0.01	0.02	0.04
	IgA	0.8	2.4	12.4
	IgM	0.1	2.3	1.6
	Albúmina	91.3	95.8	96.2
	α_2 -macroglobulina	0	5.3	11.3

Ejemplo 6: Impacto de los cambios en el proceso precedente

Además de investigar alternativas para el paso de refinado de la albúmina, se evaluaron métodos para mejorar la eficacia del paso de cromatografía de intercambio aniónico inicial en la purificación cromatográfica de la seroalbúmina humana. La resina Capto DEAE se puede utilizar como una alternativa a la DEAE Sepharose-FF y, debido a su capacidad superior, permite que se incrementen las cargas proteicas en aproximadamente un 50%. A pesar de que las características de separación de la DEAE Sepharose-FF y la Capto DEAE son similares, se observaron algunas diferencias. El eluato de albúmina de la CM Sepharose-FF, que inicialmente procedía de la DEAE Sepharose-FF, y la fracción no retenida de la Capto DEAE se caracterizaron inicialmente mediante nefelometría y análisis ELISA. Las dos muestras de albúmina se ajustaron a pH 7.0 \pm 0.1 y se clarificaron haciéndolas pasar a través de una membrana de 0.22 μ m (Durapore). Las muestras se cargaron en una columna MEP Hypercel, que se había equilibrado con acetato sódico 110 mM (pH 7.0), con volúmenes de muestra de 100, 200 y 300 mL. El flujo no retenido y el lavado posterior a la muestra se recogió como fracción global junto con el eluato a pH 3.0 Se evaluaron los niveles de albúmina en las fracciones globales por nefelometría y las proteínas impurificantes principales de IgG, IgA, IgM y α_2 -macroglobulina por ELISA.

Los estudios para identificar un paso de refinado alternativo para el proceso de albúmina cromatográfica se llevaron a cabo en paralelo con estudios para optimizar la eficacia del paso de captura de albúmina. Se ha descubierto que sustituir la DEAE Sepharose-FF actual con Capto DEAE posibilita un aumento de un 50% en la carga de muestra [Gruvegard y Almér, 2009]. Se evaluó el impacto de este cambio en el proceso en la MEP Hypercel. El uso de Capto

DEAE para el paso de captura inicial tuvo algún impacto en el eluato de albúmina resultante procedente de la columna CM Sepharose-FF. La albúmina procedente del proceso con Capto DEAE tenía un contenido de impurezas totales inferior (1.58%), en comparación con la albúmina procedente del proceso con DEAE Sepharose-FF (1.91%) (Tabla 8). Se observaron diferencias significativas en el contenido de IgA y α_2 -macroglobulina de las dos muestras. La albúmina procedente del proceso con Capto DEAE tenía niveles superiores en un factor dos de IgA, en comparación con la albúmina procedente del proceso con DEAE Sepharose-FF y niveles inferiores en un factor dos de α_2 -macroglobulina.

Tabla 8: Análisis de impurezas de la albúmina purificada por intercambio iónico procedente de los procesos con Capto DEAE y DEAE Sepharose-FF

Componente	Albúmina del proceso con DEAE Sepharose-FF		Albúmina del proceso con Capto DEAE	
	Concentración (mg/mL)	% del total	Concentración (mg/mL)	% del total
Albúmina	18.40	98.09	26.80	98.42
IgG	0.091	0.49	0.082	0.30
IgA	0.065	0.35	0.192	0.71
IgM	0.014	0.07	0.023	0.08
α_2 -macroglobulina	0.189	1.01	0.133	0.49
Impurezas totales	0.359	1.91	0.430	1.58

Tras la cromatografía con MEP Hypercel de la albúmina purificada por intercambio iónico se observaron diferencias significativas entre la albúmina procedente del proceso con Capto DEAE y del proceso con DEAE Sepharose-FF. El contenido de impurezas totales de la albúmina procedente del proceso con DEAE Sepharose-FF fue de un 0.0637% para la carga de muestra en MEP Hypercel de 100 mL y aumentó a un 0.2390% para la carga de 300 mL (Tabla 9). La impureza principal para estas muestras fue la α_2 -macroglobulina, que comprendía más de un 80% de las impurezas totales. La albúmina purificada con MEP procedente del proceso con Capto DEAE tenía niveles no detectables de α_2 -macroglobulina para todas las cargas de muestra, lo que dio como resultado contenidos de impurezas totales significativamente inferiores, en comparación con la albúmina procedente del proceso con DEAE Sepharose-FF. Los resultados sugieren que los niveles significativamente inferiores de α_2 -macroglobulina en la albúmina purificada por intercambio iónico procedente del proceso con Capto DEAE tuvieron un impacto beneficioso en la cromatografía con MEP Hypercel, lo que permitió, por tanto, cargas de muestra superiores.

Tabla 9: Contenido de impurezas de la albúmina purificada con MEP Hypercel procedente de la cromatografía con Capto DEAE y Sepharose DEAE (ND = no detectable)

Componente	Albúmina del proceso con DEAE Sepharose-FF			Albúmina del proceso con Capto DEAE		
	Carga de 100 mL	Carga de 200 mL	Carga de 300 mL	Carga de 100 mL	Carga de 200 mL	Carga de 300 mL
Albúmina	99.936	99.880	99.761	99.998	99.995	99.995
IgG	0.0001	0.0002	0.0003	0.0001	0.0003	0.0004
IgA	0.0072	0.0139	0.0263	0.0010	0.0023	0.0022
IgM	0.0019	0.0025	0.0021	0.0011	0.0020	0.0027
α_2 -macroglobulina	0.055	0.10	0.21	ND	ND	ND
Impurezas totales	0.0637	0.1201	0.2390	0.0023	0.0047	0.0053

Ejemplo 7: Estimación de la eficacia del proceso

Con el fin de comparar la eficacia del proceso de la MEP Hypercel con la Sephacryl S200HR existente, se extrapolaron las condiciones utilizadas para el procesamiento a escala piloto de la MEP Hypercel a un lote a escala completa. Esto se comparó con los datos reales para el paso de la Sephacryl S200HR. Los parámetros comparados

inclúan: tasa de flujo, tamaño de columna, carga de muestra, uso de tampones y tiempo del proceso.

Utilizando las condiciones de la MEP Hypercel determinadas a escala de laboratorio y verificadas a escala piloto, estas se extrapolaron a un proceso a escala completa para calcular varios parámetros de procesado. Los resultados se compararon con datos reales para el procesado de un lote de plasma de 10 toneladas a través de la columna Sephacryl S200HR. La reducida carga de muestra y la baja tasa de flujo utilizadas para la Sephacryl S200HR implican que se requiere una cantidad significativa de ciclos cromatográficos y tiempo para procesar un lote de 10 toneladas (Tabla 10). Esto ocurre a pesar del hecho de que la columna Sephacryl S200HR es superior a 1000 L y la muestra se concentra hasta aproximadamente 130-135 mg/mL para aumentar la eficacia del proceso.

La columna MEP Hypercel se puede cargar con cantidades significativamente superiores de muestra y se puede operar a tasas de flujo superiores a tres veces más rápido que la Sephacryl S200HR (Tabla 10). Esto implica que la columna MEP Hypercel de 198 L puede procesar la albúmina en aproximadamente la mitad del tiempo requerido que la Sephacryl S200HR. Si se utiliza una columna MEP Hypercel con un tamaño similar al de la Sephacryl S200HR (5 columnas individuales de 17.5x120 cm de DI), el lote de albúmina de 10 toneladas se puede procesar en 558 min, que representa un ahorro de un 88%, en comparación con tiempo de procesado real requerido para la Sephacryl S200HR.

La cantidad de tampón requerida para la cromatografía con MEP Hypercel es marginalmente superior que para la Sephacryl S200HR en gran parte como resultado de que la MEP Hypercel requiera lavado y regeneración después de cada ciclo, en comparación con la Sephacryl S200HR, que solamente requiere que se lleven a cabo lavado y regeneración al final de un lote.

Un beneficio adicional de la MEP Hypercel es la simplificación del proceso de purificación integral. Actualmente, es necesario concentrar el eluato de intercambio iónico desde aproximadamente 25 mg/mL hasta aproximadamente 135 mg/mL mediante ultrafiltración para maximizar la eficacia del paso de cromatografía con Sephacryl S200HR. Sin embargo, este paso de ultrafiltración no es necesario antes de la cromatografía con MEP Hypercel. El eluato de intercambio iónico solamente requiere un ajuste de pH a 7.0 antes de cargarlo en la columna MEP Hypercel.

Tabla 10: Comparación de la eficacia de refinar albúmina purificada cromatográficamente utilizando Sephacryl S200HR (90 cm x 120 cm de diámetro interno; DI) y MEP Hypercel (17.5 cm x 120 cm de DI o 87.5 cm x 120 cm de DI) para un lote de albúmina de 10 toneladas.

Parámetro	Tipo de resina (dimensiones)		
	Sephacryl S200HR	MEP Hypercel	MEP Hypercel
Volumen de la columna (L)	1018	198	990
Carga de muestra por ciclo (L)	61.1	1130	5650
Concentración proteica de la muestra (mg/mL)	130-135	20-25	20-25
Número de ciclos requeridos para procesar un lote de 10 toneladas	40	13	3
Volumen total de producto procesado para un lote de 10 toneladas (L)	2441	14449	14449
Tasa de flujo (L/min)	5.6	18.9	94.3
Consumo de tampón por lote de 10 toneladas (L)	26208	30872	35622
Tiempo requerido para procesar un lote de 10 toneladas (min)	4680	2417	558

Ejemplo 8: Caracterización de albúmina fraccionada cromatográficamente a partir de Sobrenadante I de Cohn deslipidado y desprovisto de euglobulina incorporando una cromatografía con Capto DEAE (en modo positivo respecto a la albúmina)

Se utilizó Sobrenadante I de Cohn deslipidado y desprovisto de euglobulina (15 kg) como material de partida. La disolución se clarificó utilizando un filtro de 0.22 µm. Una columna de vidrio (1374 mL) rellena con resina Capto DEAE se equilibró con acetato sódico 10 mM (pH 5.2). El SNI deslip/eug se cargó con una carga proteica de 100 g/L y una tasa de flujo de 100 cm/h. Al final de la carga de muestra, la columna se lavó con 3 volúmenes de columna de acetato sódico 10 mM (pH 5.2). La proteína no unida recogida durante la aplicación de la muestra y el lavado posterior a la muestra se derivó al procesado de inmunoglobulinas. La proteína unida se eluyó selectivamente. La primera elución, que contiene la albúmina, tiene lugar al lavar con 3 volúmenes de columna de acetato sódico 25 mM (pH 4.5). El resto de la proteína unida se eluyó lavando con 2 volúmenes de columna de NaCl 1 M y 2

volúmenes de columna de NaOH 1 M.

Una columna de vidrio (1374 mL) rellena con una resina CM Sepharose FF se equilibró con acetato sódico 25 mM (pH 4.5). El eluato de albúmina íntegro de la Capto DEAE se cargó en la columna CM Sepharose FF con una tasa de flujo de 100 cm/h. Al final de la carga de muestra, la columna se lavó con 2 volúmenes de columna de acetato sódico 25 mM (pH 4.5). La proteína unida se eluyó selectivamente. La primera elución, que contiene albúmina, tiene lugar al lavar con tres volúmenes de columna de acetato sódico 110 mM (pH 5.5). El resto de la proteína unida se eluyó lavando con 2 volúmenes de columna de NaCl 1 M y 2 volúmenes de columna de NaOH 1 M. El eluato de albúmina de la CM Sepharose-FF se ajustó a pH 7 utilizando NaOH 1 M y ácido acético 1 M.

Una columna de vidrio (1343 mL) rellena con resina MEP Hypercel se equilibró con acetato sódico 110 mM (pH 7.0). El eluato de CM con el pH ajustado se cargó con un 571% de un volumen de columna a una tasa de flujo de 100 cm/h. Después de la carga, la columna se lavó con 2 volúmenes de columna de acetato sódico 110 mM (pH 7.0). La proteína eluida durante la carga de muestra y el lavado posterior a la muestra se conservó para un procesamiento adicional. La proteína unida se eluyó de la MEP Hypercel lavando con 2 volúmenes de columna de acetato sódico 100 mM (pH 3.0) y 2 volúmenes de columna de NaOH 1 M. La albúmina purificada se procesó de acuerdo con el procedimiento para la Albúmina 2VI.

La albúmina (disolución al 20%) procedente del proceso anterior se caracterizó utilizando la prueba de liberación de lotes y una serie de pruebas adicionales para evaluar la pureza del producto. Los datos se compararon con lotes de control, que se fabricaron utilizando el proceso actual (Tabla 11).

La albúmina procedente del nuevo proceso contenía niveles inferiores de impurezas, incluidas la IgG (< 0.009 mg/mL), la apolipoproteína A1 (< 0.0032 mg/mL), la IgA (1.7 µg/mL) y el inhibidor de α₁-proteínasa (0.039 mg/mL), en comparación con el control de albúmina (Tabla 11). El contenido de impurezas inferior de la albúmina procedente del nuevo proceso dio como resultado niveles de agregados (0.6%) y niveles de turbidez (2.0 NTU) inferiores.

Tabla 11: Disolución de albúmina para caracterización recuperada mediante este método

Tipo de prueba (Número de prueba)	Límites / Valores esperados	Número de lote a escala de laboratorio	
		Lotes de prueba (n = 3)	Lotes de control (n = 3)
Acidez o alcalinidad (QB5931)	6.9 a 7.3	7.2	7.2
Composición proteica - SEHPLC (QB6618)	Agregados ≤ 10%	0.6	1.7
	Dímero - A modo informativo	1.4	1.3
	Monómero - A modo informativo	98.0	97.0
	Fragmentos - A modo informativo	0	0
Sodio (QB6365)	48 a 100 mmol/L	85.4	79.7
Composición proteica (QB8222)	≥ 95% albúmina	100	100
Concentración proteica (QB3950)	19.0 a 21.0% p/v	22.3	19.8
Activador de la precalicreína (PKA) (QB8270)	28.6 UI/mL	< 1	< 1
Aluminio (QA6430)	≤ 80 µg/L	104.7	26.7
Caprilato (QB6491)	27.2 a 36.8 mmol/L	33.6	31.0
Recuento de viables (QB2680)	No se detectaron viables	0	0
Apariencia (QB5908)	Líquido ligeramente viscoso, transparente, con amarillo, ámbar o verde descolorido.	Satisfactoria	Satisfactoria
Osmolalidad (QB6780)	A modo informativo	134	131.7
ELISA de IgA (QB3344)	A modo informativo	1.69	4.1
IgG (QB4420)	A modo informativo	< 0.009	0.162

Tipo de prueba (Número de prueba)	Límites / Valores esperados	Número de lote a escala de laboratorio	
		Lotes de prueba (n = 3)	Lotes de control (n = 3)
Transferrina (QB0436)	A modo informativo	< 0.020	< 0.020
α_2 -macroglobulina (QB0432)	A modo informativo	< 0.024	< 0.024
Apolipoproteína A1 (QB0443)	A modo informativo	< 0.0032	0.039
α_1 -glicoproteína (QB0433)	A modo informativo	< 0.012	< 0.012
Inhibidor de α_1 -proteinasas (QB0434)	A modo informativo	0.039	0.079
Haptoglobina (QB0438)	A modo informativo	< 0.034	< 0.034
Inhibidor de inter- α -tripsina (QB0435)	A modo informativo	< 0.063	< 0.063
Turbidez (QB0496.)	A modo informativo	2.0	5.6
Endotoxina (QB9881)	A modo informativo	0.61	<0.06

Ejemplo 9: Caracterización de albúmina fraccionada por cromatografía con CM Sepharose

El eluato de albúmina procedente de la cromatografía con Capto DEAE o DEAE Sepharose FF se ajustó a pH 5.4 y a una conductividad de 5.0 mS/cm utilizando NaOH 1 M y ácido acético 1 M.

- 5 Una columna de vidrio rellena con resina CM Sepharose FF se equilibró con acetato sódico (pH 5.4, conductividad 5.0 mS/cm). La muestra de eluato de DEAE ajustada se cargó con una carga proteica de 500 g/L y una tasa de flujo de 100 cm/h. Al final de la carga, la columna se lavó con dos volúmenes de columna de acetato sódico (pH 5.4, conductividad 5.0 mS/cm). La proteína no unida recogida durante la aplicación de la muestra y el lavado posterior a la muestra se conservó para un procesamiento adicional. La proteína unida se eluyó lavando con 2 volúmenes de columna de NaCl 1 M y 2 volúmenes de columna de NaOH 1 M. La muestra de albúmina se ajustó a pH 7.0 utilizando NaOH 1 M y ácido acético 1 M. Una columna de vidrio rellena con una resina MEP Hypercel se equilibró con acetato sódico (pH 7.0, conductividad 5.0 mS/cm). La albúmina con el pH ajustado se cargó con una carga proteica de 150 g/L y una tasa de flujo de 75 cm/h. Después de la carga, la columna se lavó con 2 volúmenes de columna de acetato sódico (pH 7.0, conductividad 5.0 mS/cm). La proteína eluida durante la carga de muestra y el lavado posterior a la muestra se conservó para un procesamiento adicional. La proteína unida se eluyó de la MEP Hypercel lavando con 2 volúmenes de columna de acetato sódico 100 mM (pH 3.0).

La pureza de una muestra de albúmina procedente de una cromatografía con DEAE Sepharose FF se caracterizó después de la cromatografía con CM Sepharose FF utilizando el procedimiento actual y el procedimiento optimizado (descrito anteriormente). Los resultados muestran que el método con CM Sepharose FF actual da como resultado aumentos moderados de la pureza de la albúmina (Tabla 12). Esto se asocia principalmente con la eliminación de la transferrina. La cromatografía con CM Sepharose FF optimizada da como resultado reducciones significativas en los niveles de transferrina y α_2 -macroglobulina, además de algunas reducciones en la IgG e IgA. Como la α_2 -macroglobulina es la impureza más difícil de eliminar utilizando la MEP Hypercel, las condiciones optimizadas para la CM Sepharose FF permiten cargas superiores en la MEP Hypercel.

25 Tabla 12: Análisis de pureza de la albúmina durante la cromatografía con CM Sepharose FF

Componente	% de proteína total		
	Eluato de DEAE	Eluato de CM Sepharose	Eluato de CM Sepharose optimizada
Albúmina	97.36	98.07	99.38
IgG	0.49	0.48	0.24
IgA	0.25	0.26	0.16
IgM	0.05	0.04	0.05
Transferrina	0.66	0.07	<0.10
α_2 -macroglobulina	1.20	1.08	0.10

Ejemplo 10: Caracterización de la albúmina fraccionada cromatográficamente a partir del Sobrenadante II+III de Cohn o el Filtrado A que incorpora la cromatografía con Capto DEAE

- 5 El SN II + III o Filtrado A se concentró por ultrafiltración, a continuación, se diafiltró frente a 5 volúmenes de PFW para reducir los niveles de etanol y sales. El SN II + III o Fracción A diafiltrada se ajustó a pH 4.5 y a una conductividad de 2.0 mS/cm utilizando NaOH 1 M y ácido acético 1 M. Se añadió Aerosil 380 con 160 g/kg de proteína para unir lipoproteínas. Se añadió Diacel con 400 g/kg de proteína para facilitar la clarificación utilizando una prensa de filtro. La prensa de filtro se puede recuperar utilizando acetato sódico 25 mM (pH 4.5, conductividad 2 mS/cm).
- 10 Una columna de vidrio rellena con resina Capto DEAE se equilibró con acetato sódico 25 mM (pH 4.5, conductividad 2.0 mS/cm). La muestra de SN II + III Deslipidada y Diafiltrada se cargó con una carga proteica de 1000 g/L y una tasa de flujo de 100 cm/h. Al final de la carga, la columna se lava con 2 volúmenes de columna de acetato sódico 25 mM (pH 4.5, conductividad 2.0 mS/cm). La proteína no unida recogida durante la aplicación de la muestra y el lavado posterior a la muestra se conservó para un procesado adicional. La proteína unida se eluyó
- 15 lavando con 2 volúmenes de columna de NaCl 1 M y 2 volúmenes de columna de NaOH 1 M. La muestra de albúmina se ajustó a pH 5.4 y a una conductividad de 5.0 mS/cm utilizando NaOH 1 M y ácido acético 1 M. El procedimiento para los pasos posteriores con CM Sepharose FF y MEP Hypercel son idénticos a los descritos en el Ejemplo 10. La purificación con Capto DEAE (modo negativo) del SN II + III se comparó con la Capto DEAE llevada a cabo en modo positivo (Tablas 13 y 14). Los resultados muestran que las proteínas recuperadas en la fracción no retenida a partir de la Capto DEAE en modo negativo (Tabla 14) son la suma de las proteínas recuperadas en las fracciones no retenida y de eluato a partir de la Capto DEAE en modo positivo (Tabla 13). La eficacia de la Capto DEAE en modo negativo está respaldada además por el hecho de que la fracción de lavado (NaCl 1 M) para la purificación con Capto DEAE tanto en modo positivo como negativo del SN II + III tuvo recuperaciones de proteínas
- 20 totales similares. Esta fracción de lavado habitualmente contiene proteínas que incluyen IgA, haptoglobina, ceruloplasmina y α_1 -glicoproteína, la mayoría de las cuales no se midieron en este estudio.
- 25

Tabla 13: Recuperación de proteínas durante la purificación con Capto DEAE (modo positivo) del SN II + III (ND = no detectado en la fracción)

Proteína	% del total cargado		
	No retenida	Eluato	Lavado
IgG	90.4	ND	2.2
IgA	48.0	15.9	36.5
IgM	ND	ND	ND
Albúmina	12.9	97.1	0.4
Transferrina	86.6	ND	ND
α_2 -macroglobulina	ND	ND	ND
Proteína total	20.5	78.1	7.2

30 Tabla 14: Recuperación de proteínas durante la purificación con Capto DEAE (modo negativo) del SN II + III (ND = no detectado en la fracción)

Proteína	% del total cargado	
	No retenida	Lavado
IgG	103.7	ND
IgA	98.7	20.0
IgM	ND	ND
Albúmina	86.7	0.2
Transferrina	97.8	ND
α_2 -macroglobulina	ND	ND
Proteína total	102.9	6.9

5 Dado que la muestra de SN II + III contiene niveles elevados de transferrina y que la transferrina coeluye con la albúmina durante la cromatografía con Capto DEAE en modo negativo, se evaluó la capacidad de la CM Sepharose-FF en modo negativo para eliminar la transferrina de la albúmina. La recuperación de proteína para la purificación con CM Sepharose-FF en modo negativo del SN II + III muestra que se recuperaron niveles elevados de transferrina en la fracción de lavado (91.3%) y se recuperaron niveles no detectables en la fracción de la albúmina (Tabla 15). En general, las recuperaciones de proteínas para la muestra de SN II + III fueron similares a las observadas para la CM Sepharose-FF en modo negativo de la albúmina procedente del SNI.

10 Tabla 15: Recuperación de proteínas durante la purificación con CM Sepharose-FF (modo negativo) del SN II + III (ND = no detectado en la fracción; D# = Niveles detectables en la fracción, sin embargo, no detectable en el material de partida, lo que implica que la recuperación de proteína no se pudo determinar)

Proteína	% del total cargado	
	No retenida	Lavado
IgG	66.8	31.4
IgA	75.9	20.8
IgM	ND	ND
Albúmina	88.8	0.4
Transferrina	ND	91.3
α_2 -macroglobulina	ND	D#
Proteína total	81.1	9.6

Ejemplo 11: Caracterización de la albúmina fraccionada cromatográficamente a partir del Sobrenadante II + II de Cohn Deslipidado utilizando ANX Sepharose, CM Sepharose y MEP Hypercel en modo negativo

15 El Sobrenadante II + III de Cohn Deslipidado se utilizó como material de partida y se ajustó a pH 4.7 y a una conductividad de 1.8 mS/cm. La disolución se clarificó utilizando un filtro de 0.22 μ m. Una columna de vidrio (35 mL) rellena con una resina ANX Sepharose-FF se equilibró con acetato sódico (pH 4.7, conductividad 1.8 mS/cm). El SN II + III Deslipidado ajustado se cargó con una carga proteica de 300 g/L y una tasa de flujo de 100 cm/h. Al final de la carga de muestra, la columna se lavó con 3 volúmenes de columna de acetato sódico (pH 4.7, conductividad 1.8 mS/cm). La proteína no unida recogida durante la aplicación de la muestra y el lavado posterior a la muestra se recogió y conservó para el procesamiento de la albúmina. La proteína unida se eluyó lavando con 2 volúmenes de columna de NaCl 1 M y 2 volúmenes de columna de NaOH 1 M.

25 Una columna de vidrio (35 mL) rellena con una resina CM Sepharose FF se equilibró con acetato sódico (pH 5.4, conductividad de 5.0 mS/cm). El flujo no retenido de albúmina de la ANX Sepharose-FF se ajustó a pH 5.4 y a una conductividad de 5.0 mS/cm y se clarificó utilizando un filtro de 0.22 μ m. El flujo no retenido de ANX ajustado se cargó en la columna CM Sepharose FF con una carga de 300 g/L y a una tasa de flujo de 100 cm/h. Al final de la carga de muestra, la columna se lavó con 2 volúmenes de columna de acetato sódico (pH 5.4, conductividad 5.0 mS/cm). La proteína no unida eluida durante la aplicación de la muestra y el lavado posterior a la muestra se recogió y conservó para el procesamiento de la albúmina y las pruebas de caracterización. La proteína unida se eluyó lavando con 2 volúmenes de columna de NaCl 1M y 2 volúmenes de columna de NaOH 1 M.

30 El flujo no retenido de albúmina de la CM Sepharose FF se ajustó a pH 7.0 utilizando NaOH 1 M y ácido acético 1 M. Una columna de vidrio (35 mL) rellena con una resina MEP Hypercel se equilibró con acetato sódico 110 mM (pH 7.0). El flujo no retenido de CM con el pH ajustado se cargó con 150 g/L y una tasa de flujo de 75 cm/h. Tras la carga, la columna se lavó con 2 volúmenes de columna de acetato sódico 110 mM (pH 7.0). La proteína no unida eluida durante la carga de muestra y el lavado posterior a la muestra se conservó para las pruebas de caracterización. La proteína unida se eluyó de la MEP Hypercel lavando con 2 volúmenes de columna de acetato sódico 110 mM (pH 3.0) y 2 volúmenes de columna de NaOH 1 M.

35 Las disoluciones de albúmina procedentes del proceso anterior después de los pasos del proceso de CM Sepharose-FF y MEP Hypercel se caracterizaron utilizando ELISA específicos para evaluar la pureza del producto. Los datos se compararon con muestras de control de eluato de CM concentrado y monómero de albúmina concentrado posterior a exclusión por tamaño, que se fabricaron utilizando el proceso de purificación de albúmina actual de CSL Biotherapies.

5 El intermedio de albúmina obtenido después de cargar el SN II + III Deslipidado en la ANX Sepharose-FF y CM Sepharose-FF que operaba en modo negativo tuvo una pureza superior (99.16%) que el intermedio de albúmina equivalente procedente del proceso actual (98.41%) (Tabla16). Esta diferencia se atribuyó principalmente a niveles significativamente inferiores de α_2 -macroglobulina y α_1 -antitripsina. La albúmina procedente de la ANX Sepharose y CM Sepharose en modo negativo sí que contenía, sin embargo, más IgG (0.46%) que la albúmina procedente del proceso actual (0.28%).

Tabla 16: Composición proteica del eluato de CM (proceso actual) y de la albúmina procedente de la cromatografía con ANX Sepharose FF y CM Sepharose FF en modo negativo

Componente proteico	% de proteína total	
	Posterior a CM Sepharose (del proceso actual)	Albúmina procedente de la cromatografía con ANX Sepharose-FF y CM Sepharose-FF en modo negativo
IgG	0.28	0.46
IgA	0.23	0.18
IgM	0.07	0.00
Albúmina	98.41	99.16
α_1 -antitripsina	0.23	0.06
Haptoglobina	0.02	0.03
Ceruloplasmina	0.00	0.00
α_2 -macroglobulina	0.74	0.10
Transferrina	0.00	0.01
α_1 -glicoproteína	0.01	0.00

10

La albúmina procedente de la MEP Hypercel tenía una pureza elevada (99.96%) superior a la observada para la albúmina procedente del proceso actual (99.90%) (Tabla 17). La albúmina purificada utilizando la MEP Hypercel contenía niveles bajos de IgG (0.01%).

15 Tabla 17: Composición proteica del monómero de albúmina (procedente de Sephacryl S200HR) y de la albúmina procedente de la cromatografía con ANX Sepharose-FF, CM Sepharose-FF y MEP Hypercel en modo negativo.

Componente proteico	% de proteína total	
	Monómero de albúmina (del proceso actual)	Albúmina procedente de la cromatografía con ANX Sepharose-FF, CM Sepharose-FF y MEP Hypercel en modo negativo
IgG	0.09	0.01
IgA	0.01	0.01
α_2 -macroglobulina	< 0.01	0.02
Albúmina	99.90	99.96

20 Los datos respaldan el uso de un paso cromatográfico (en modo negativo respecto a la albúmina) que emplee una matriz de afinidad tal como la MEP Hypercel para el refinado de albúmina procedente de diferentes fuentes (p. ej., SNI, II + III o Filtrado A) y condiciones diferentes para los pasos cromatográficos de intercambio iónico precedentes. El hecho de que los pasos de intercambio iónico en modo negativo tengan como objetivo la unión de proteínas impurificantes hace la cromatografía de membrana más atractiva y se podría transferir a formatos de cromatografía de membrana industriales.

25 Los pasos de cromatografía de intercambio iónico utilizados en los procesos a escala industrial existentes (tales como los utilizados por CSL, Australia para fabricar Albumex, que comprende DEAE Sepharose-FF y CM Sepharose-FF) son muy eficaces para la purificación de la seroalbúmina humana. El intermedio de SNI de Cohn deslipidado y desprovisto de euglobulina, que se carga en la columna DEAE Sepharose-FF inicial, tiene una pureza de aproximadamente un 70% y aumenta a más de un 98% después del procesado a través de las dos columnas de intercambio iónico. Este proceso de intercambio iónico selecciona las proteínas con valores de pI entre 4.5 y 5.2.

Prin *et al.* [1995] mostraron que los intervalos de punto isoelectrico (pI) de IgG, IgA e IgM son amplios y se solapan con la ventana de pI seleccionada por las columnas DEAE Sepharose-FF y CM Sepharose-FF en el proceso de Albumex. Dado este amplio intervalo de pI de las inmunoglobulinas, no se puede esperar que la cromatografía de intercambio iónico elimine todos los contaminantes de tipo inmunoglobulina de la albúmina y, por tanto, pone de manifiesto la necesidad de un modo ortogonal de purificación de la albúmina.

Los experimentos descritos en la presente muestran que el pH de la muestra y del equilibrado puede ser un parámetro importante para la separación de la albúmina y la IgG en la MEP Hypercel en ciertas condiciones. La molaridad y el tipo de tampón no parece que tengan ningún impacto apreciable en la separación a pH 7.0. Debido a que la albúmina se eluye de la columna CM Sepharose-FF a pH 5.5 en un tampón de acetato sódico 110 mM, la albúmina requeriría únicamente un ajuste de pH menor antes de cargarla en la columna MEP Hypercel.

La adición de cloruro sódico al tampón de acetato sódico a pH 5.5 mejoró la selectividad entre la IgG y la albúmina. Estudios previos han mostrado que la capacidad de la MEP Hypercel para unir IgG no se potencia [Schwartz *et al.*, 2001] o se puede incluso reducir [Chen *et al.*, 2008] por la adición de sales. Sin embargo, estos estudios previos se llevaron a cabo utilizando muestras a valores de pH neutro, en comparación con el pH 5.5 utilizado en el estudio actual, que es relativamente cercano al pKa del ligando MEP a 4.8 [Burton y Harding, 1998]. Se mostró que la adición de cloruro sódico 50 mM al tampón de acetato sódico a pH 7.0 no mejoraba la eliminación de proteínas impurificantes de la albúmina procedente de CM Sepharose-FF.

Los análisis de penetración durante la carga del eluato de albúmina con el pH ajustado procedente de CM Sepharose-FF en la MEP Hypercel mostraron diferencias significativas en la unión de las cuatro proteínas impurificantes principales que se investigaron. La MEP Hypercel mostró la capacidad más elevada para tanto IgG como IgA y una capacidad muy inferior para IgM y α_2 -macroglobulina. La capacidad reducida se puede atribuir, al menos en parte, a efectos de impedimento estérico y exclusión por tamaño. Esto está respaldado adicionalmente por el hecho de que la α_2 -macroglobulina, que tiene una masa molecular similar a la IgM, también tuvo una capacidad de unión baja en la MEP Hypercel. Otro posible factor contribuyente para la baja capacidad de la MEP Hypercel por la α_2 -macroglobulina es que esta tiene una solubilidad superior que las gammaglobulinas (IgG, IgA e IgM) en etanol, con las α -globulinas aisladas en la Fracción IV de Cohn [Cohn *et al.*, 1946].

Parece ser que la MEP Hypercel tiene una selectividad más amplia por las impurezas en la albúmina purificada cromatográficamente. La MEP Hypercel no solo puede eliminar las impurezas de elevado peso molecular, sino que también puede eliminar cantidades significativas de apolipoproteína A1. La Sephacryl S200HR utilizada en muchos de los métodos existentes para la purificación cromatográfica (refinado) de la albúmina no elimina ninguna apolipoproteína A1 de la albúmina, ya que su masa molecular (28 kDa) es menor que la de la albúmina y, por lo tanto, coeluye con la fracción del monómero de albúmina.

La incorporación de la MEP Hypercel a procesos existentes tales como el proceso de fabricación de Albumex 20™ (CSL, Australia) tiene un impacto mínimo en los procesos anteriores y posteriores. En el proceso de Albumex 20 actual, por ejemplo, la albúmina eluida de la columna Sephacryl S200HR está en un tampón de acetato 50 mM y se diafiltra frente a agua para eliminar los iones de sodio y acetato. La albúmina purificada procedente de la columna MEP Hypercel está en un tampón de acetato sódico 110 mM y, por lo tanto, requeriría un volumen de diafiltración adicional para lograr un producto equivalente al proceso existente. Sin embargo, el tiempo adicional requerido para llevar a cabo la diafiltración extra no es significativo. Un beneficio adicional al aumento significativo en la eficacia del proceso proporcionada por la MEP Hypercel es que el producto de albúmina purificada ya no requiere concentrar tras la elución de la columna CM Sepharose-FF (intercambio iónico). La omisión de este paso también da como resultado ahorros de tiempo significativos y ahorros de costes continuados considerables asociados a que ya no se requiera mantener el equipo de ultrafiltración. Uno de los mayores atractivos del uso de MEP Hypercel como medio para la separación basada en la hidrofobicidad de las proteínas es su capacidad para separar sin el requisito de añadir sales liotrópicas. Basándose en los cálculos sobre la eficacia del proceso para un lote de 10 toneladas de albúmina y asumiendo que una separación con HIC requeriría una concentración de transferencia de amonio de 1 M en la muestra y tampón de equilibrado, se requerirían más de 3 toneladas de sulfato amónico. Esto presenta una serie de problemas que incluyen coste, manipulación, procesado posterior adicional para eliminar la sal y desechado, particularmente para la transferencia de amonio, ya que este puede causar eutrofización si se libera en cursos de agua. Los aumentos de la eficacia conseguidos con la MEP Hypercel implican que el paso de refinado ya no es un cuello de botella en el proceso. También implica que el tamaño de la columna se puede reducir significativamente, lo que da como resultado un impacto menor en la infraestructura de fabricación y que se mantengan menos volúmenes de resina en las existencias.

En la presente queda demostrada la eficacia de la cromatografía de afinidad en modo negativo (respecto a la albúmina), en particular, la cromatografía MEP Hypercel, como paso de refinado para una albúmina purificada cromatográficamente por intercambio iónico explotando las diferencias en la hidrofobicidad de las proteínas impurificantes, en comparación con la albúmina.

Se prevé que la MEP Hypercel ofrecerá un método para refinar la seroalbúmina humana procedente de otros

esquemas de purificación, particularmente aquellos que no precipitan la Fracción V. Este método será particularmente relevante para los fraccionadores de plasma menores que ya tienen procesos de purificación cromatográfica similares a, por ejemplo, el proceso de Albumex 20. También debería resultar atractivo para las empresas y países menores que estén planeando establecer su propio proceso de fraccionamiento de plasma, para el cual sean adecuados los procesos de purificación cromatográfica.

La presente invención ofrece mejoras significativas en la eficacia del proceso, en comparación con la cromatografía de filtración en gel existente y se puede integrar perfectamente en un proceso de fabricación de albúmina existente, puesto que la separación deseada se puede lograr utilizando los tampones de acetato sódico que ya se utilizan en los pasos precedentes y no requiere la adición de sales liotrópicas. Este método de refinado tiene un beneficio inmediato para los fraccionadores de volúmenes menores de plasma que emplean métodos cromatográficos, sin embargo, los aumentos significativos de eficacia proporcionados por la MEP Hypercel podrían hacer más atractiva la purificación cromatográfica de la albúmina para fraccionadores de volúmenes medios a grandes de plasma comercial.

Referencias

Arakawa T, Kita Y, Sato H, Ejima D (2009) *MEP chromatography of antibody and Fc-fusion protein in aqueous arginine solution. Protein Expression and Purification* 63:158-163.

Arakawa T, Futatsumori-Sugai M, Tsumoto K, Kita Y, Sato H, Ejima D (2010) *MEP Hypercel chromatography II: Binding, washing and elution. Protein Expression and Purification* 71:168-173.

Berglof JH, Eriksson S, Curling JM (1983) *Chromatographic preparation and in vitro properties of albumin from human plasma. J App Biochem* 5:282-292.

Bertolini J, Davies J, Wu J, Pritchard K, Seneviratne G, Stuckley K, Fogarty K; Goss NH (1999) *Chromatographic purification of immunoglobulins. Plasma Product Biotechnology Meeting, Isla Daydream, Australia, marzo 27-30.*

Burton SC, Harding DRK (1998) *Hydrophobic charge induction chromatography: salt independent protein adsorption and facile elution with aqueous buffers. J Chromatogr A* 814:71-81.

Cabrera-Crespo J, Goncalves VM, Martins EA, Grellet S, Lopes AP, Raw I (2000) *Albumin purification from human placenta. Biotechnol Appl Biochem* 31:101-106.

Campbell WR, Hanna MI (1937) *The albumin, globulins and fibrinogen of serum and plasma. J Biol Chem* 119(1):15-33.

Che Y, Wilson FJ, Bertolini J, Schiff P, Maher DW (2006) *Impact of manufacturing improvements on clinical safety of albumin: Australian pharmacovigilance data for 1988-2005. Crit Care Resusc* 8(4):334-338.

Chen J, Tetrault J, Ley A (2008) *Comparison of standard and new generation hydrophobic interaction chromatography resins in the monoclonal antibody purification process. J Chromatogr A* 1177:272-281.

Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, Taylor HL (1946) *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. J Am Chem Soc* 68:459-475.

Coulon D, Cabanne C, Fitton V, Noubhani AM, Saint-Christophe E, Santarelli X (2004) *Penicillin acylase purification with the aid of hydrophobic charge induction chromatography. Journal of Chromatography B* 808:111-115.

Cullen GE, Van Slyke DD (1920) *Determination of the fibrin, globulin and albumin nitrogen of blood plasma J Biol Chem* 41:587-597.

Ghose S, Hubbard B, Cramer S (2006) *Evaluation and comparison of alternatives to Protein A chromatography - Mimetic and hydrophobic charge induction chromatographic stationary phases. Journal of Chromatography A* 1122:144-152.

Goheen SC, Matson RS (1985) *Purification of human serum gamma globulins by hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography* 326:235-241.

Gruegard M, Allmér K (2009) *Designing next generation chromatography media for modern high-throughput plasma processes. Plasma Product Biotechnology Meeting, Menorca, España, mayo, 11-15.*

- Kistler P, Nitschmann HS (1962) *Large-scale production of human plasma fractions*. *Vox Sang* 7:414-424.
- 5 Marrs SB (1993) *Large scale albumin fractionation by chromatography*. In *Biotechnology of Blood Proteins* (Rivat C, Stoltz J-F eds.) Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. págs. 169-173.
- Martins EA, Cheng E, Raw I (2011) *Plasma fractionation facility at Instituto Butantan - Sao Paulo - Brasil*. *Plasma Product Biotechnology Meeting*, Paphos, Chipre, mayo 2011.
- 10 Melander W, Horvath C (1977) *Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins; an interpretation of the lyotropic series*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 183:200-215.
- More JE, Harvey MJ (1991) *Purification technologies for human plasma albumin*. In *Blood Separation and Plasma Fractionation* (Harris JR ed.) Wiley-Liss, Nueva York. págs 261-306.
- 15 Ohmura T, Sumi A, Ohtani W, Fuluhata N, Takeshima K, Kamide K, Noda M, Kondo M, Ishikawa S, Oohara K, Yokoyama K (1995) *Recombinant human serum albumin, process for producing the same and pharmaceutical preparation containing the same*. Patente de EE. UU. 5440018.
- 20 Pezzini J, Joucla G, Gantier R, Toueille M, Lomenech A-M, Le Senechal C, Garbay B, Santarelli X, Cabanne C (2011) *Antibody capture by mixed mode chromatography: A comprehensive study from determination of optimal purification conditions to identification of contaminating host cell proteins*. *Journal of Chromatography A* 1218:8197-8208.
- 25 Prin C, Bene MC, Gobert B, Montagne P, Faure GC (1995) *Isoelectric restriction of human immunoglobulin isotypes*. *Biochim Biophys Acta*, 1243:287-290.
- Ramos-Clamont G, del Carmen Candia-Plata M, Zamudio RG, Vazquez-Moreno L (2006) *Novel hydrophobic interaction chromatography matrix for specific isolation and simple elution of immunoglobulins (A, G and M) from porcine serum*. *Journal of Chromatography A* 1122:28-34.
- 30 Rucheton M, Stefas E, Graafland H (1997) *Method for purifying an aqueous solution of raw albumin*. Patente de EE. UU. 5677424.
- 35 Schwartz W, Judd D, Wysocki M, Guerrier L, Birck-Wilson E, Boschetti E (2001). *Comparison of hydrophobic charge induction chromatography with affinity chromatography on protein A for harvest and purification of antibodies*. *J Chromatogr A*, 908:251-263.
- 40 Véron J-L, Gattel P, Pla J, Fournier P, Grandgeorge M (1993) *Combined Cohn/chromatography purification process for the manufacture of high purity human albumin from plasma*. In *Biotechnology of Blood Proteins* (Rivat C, Stoltz J-F eds.) Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. págs. 183-188.
- 45 Yap HB, Young IF, Micucci V, Herrington RW, Turner PJ, Davies JR (1993) *Development of a process for the preparation of human serum albumin using chromatographic methods*. In *Biotechnology of Blood Proteins* (Rivat C, Stoltz J-F eds.) Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. págs. 143-149.

REIVINDICACIONES

1. Un método para refinar albúmina con el fin de eliminar contaminantes que comprende hacer pasar una disolución enriquecida en albúmina a través de una resina cromatográfica de inducción de carga hidrófoba y recuperar la disolución de albúmina que pasa a través de la resina.
- 5 2. El método de la reivindicación 1, donde la resina cromatográfica de inducción de carga hidrófoba comprende 4-mercaptoetilpiridina.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde la disolución enriquecida en albúmina se selecciona a partir de Sobrenadante I de Cohn, Sobrenadante II + III de Cohn, Sobrenadante/Filtrado A, Fracción V y Sobrenadante IV de Cohn.
- 10 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la disolución enriquecida en albúmina es un Sobrenadante I de Cohn diafiltrado.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la disolución enriquecida en albúmina está deslipidada y desprovista de euglobina.
- 15 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde antes de hacer pasar la disolución enriquecida en albúmina a través de la resina cromatográfica de inducción de carga hidrófoba, el método comprende los pasos de (a) hacer pasar la disolución a través de una resina de intercambio aniónico en modo negativo respecto a la albúmina y (b) hacer pasar la disolución a través de una resina de intercambio catiónico en modo negativo respecto a la albúmina.
- 20 7. El método de la reivindicación 6 que comprende hacer pasar la fracción no retenida de la resina de intercambio aniónico del paso (a) a través de una resina de intercambio catiónico en el paso (b).
8. El método de la reivindicación 6 que comprende hacer pasar la fracción no retenida de la resina de intercambio catiónico del paso (b) a través de la resina de intercambio aniónico en el paso (a).
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende pasteurizar la disolución de albúmina refinada.

25

FIGURA 1

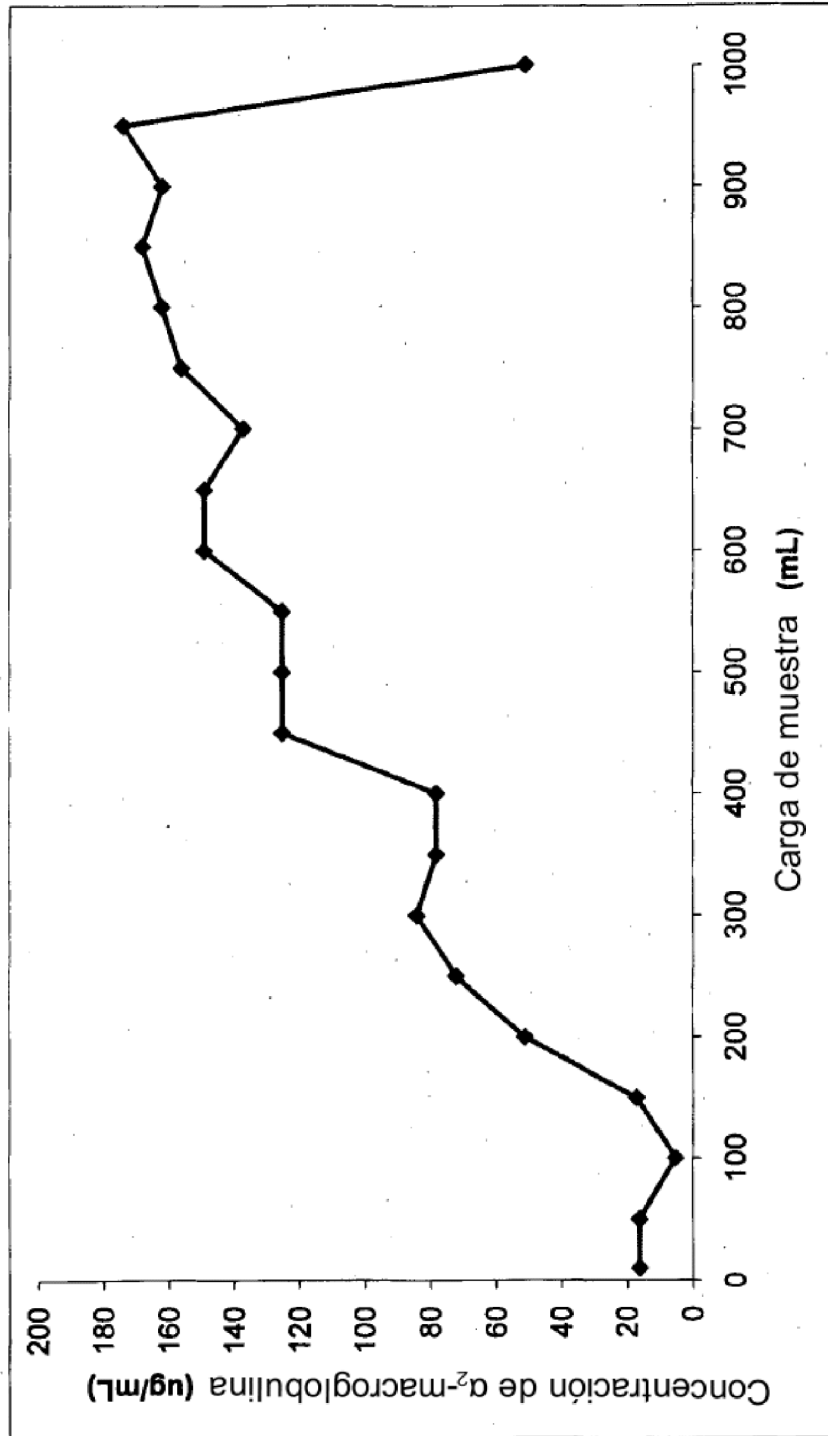


FIGURA 2

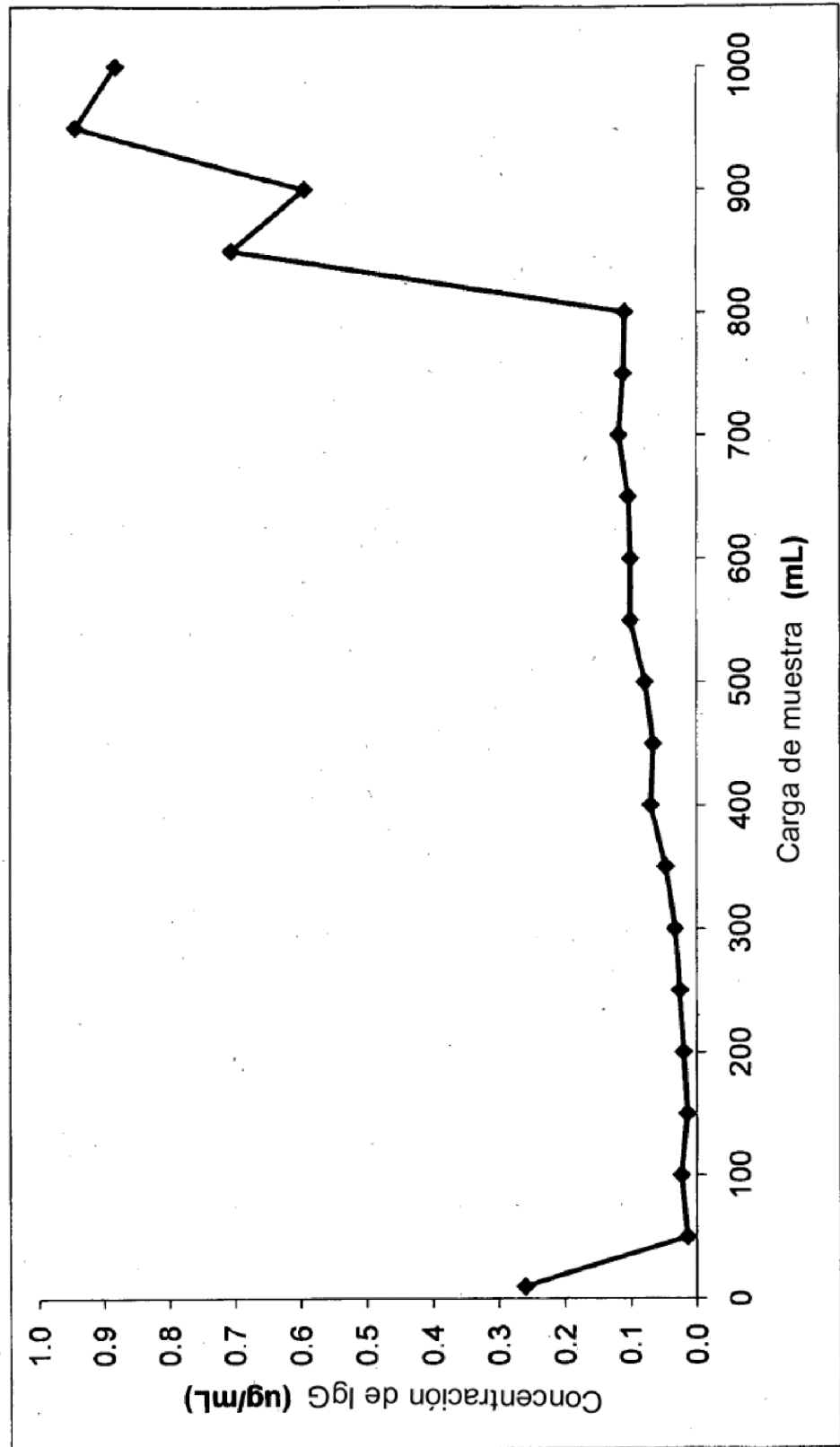


FIGURA 3

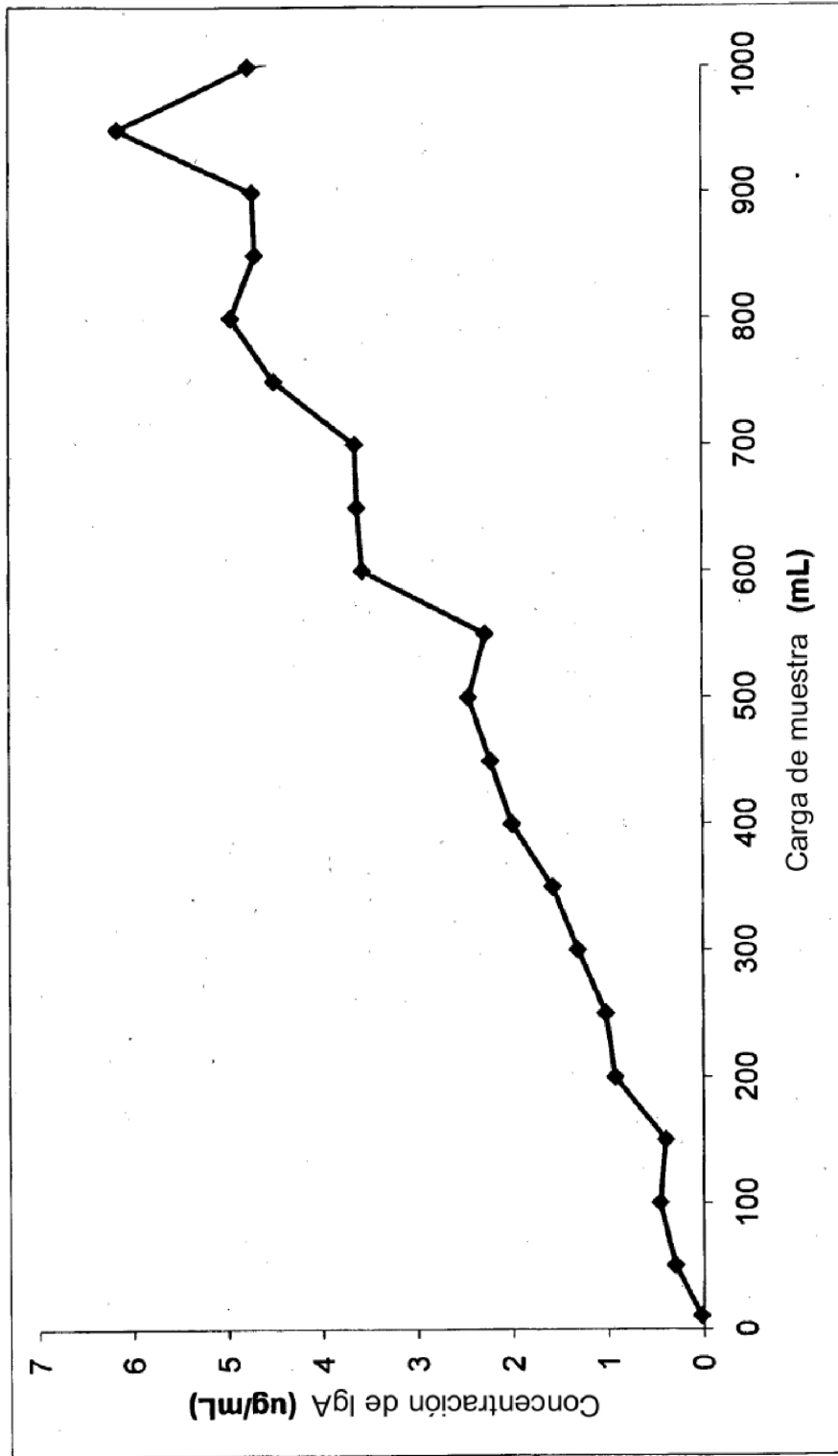


FIGURA 4

