

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 026**

51 Int. Cl.:

A61L 2/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2008** E **15198333 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018** EP **3034097**

54 Título: **Un proceso para aislamiento y purificación de una proteína diana libre de proteína priónica (PrP^{Sc})**

30 Prioridad:

23.08.2007 EP 07114856

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

04.06.2018

73 Titular/es:

**OCTAPHARMA AG (100.0%)
Seidenstrasse 2, Postfach
8853 Lachen , CH**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 671 026 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 proceso para aislamiento y purificación de una proteína diana libre de proteína priónica (PrP^{Sc})

- 5 La presente invención se refiere a un proceso para aislamiento y purificación de una proteína diana que está libre de la Forma de proteína PrP^{Sc} asociada a enfermedad.

En los últimos tiempos se le ha atribuido un aumento de la atención al enfoque en la inactivación y eliminación de PrP^{Sc} en métodos de purificación para fármacos obtenidos a partir de plasma sanguíneo. La razón fue
10 evidentemente del brote de la enfermedad de las vacas locas, etc. Incluso el uso de líneas celulares recombinantes para producción de fármacos biofarmacéuticos no se contempla como completamente seguro con respecto a la aparición de proteínas priónicas (Vorberg *et al.*, The Journal of infectious diseases 2004; 189: 431-9. Susceptibility of common fibroblast cell lines to transmissible spongiform encephalopathy agents). Durante el trabajo para definir un proceso de purificación para proteínas destinadas a fármacos biofarmacéuticos, se pueden evaluar diferentes etapas de purificación como posibles etapas de eliminación de proteínas priónicas (Foster PR *et al.*, Distribution of a bovine spongiform encephalopathy-derived agent over ion-exchange cromatography used in the preparation of concentrates of fibrinogen and factor VIII; Vox Sang., febrero de 2004; 86 (2): 92-9; Trejo SR *et al.*, Evaluation of virus and prion reduction in a new intravenous immunoglobulin manufacturing process. Vox Sang., abril de 2003; 84 (3): 176-87; Zeiler B *et al.*, Concentration and removal of prion proteins from biological solutions; Biotechnol Appl Biochem., abril de 2003, 37 (Pt 2): 173-82; Foster *et al.*, Studies on the removal of abnormal prion protein by processes used in the manufacture of human blood plasma products, Vox Sang. 2000, 78: 86-95; Burnouf *et al.*, Transfus Clin Biol., noviembre de 2006; 13 (5): 320-8. Epub 23 de enero de 2007, Current strategies to prevent transmission of prions by human plasma derivatives.

25 Se ha mostrado que las resinas de cromatografía son capaces de contribuir a la eliminación de PrP^{Sc} en un proceso de purificación. Sin embargo, se ha indicado que el hecho de que los factores de eliminación de PrP^{Sc} coherentes se encuentran en procesos que usan resinas de cromatografía de diferente estructura y sustituciones químicas y en diferentes sistemas de tampón, apoya la aparición de unión no específica del agente infeccioso sobre la superficie del soporte de cromatografía. Aunque la retirada de PrP^{Sc} parece reproducible, la comprensión incompleta del mecanismo de eliminación suscita preguntas, tales como cómo (a) determinar la capacidad máxima de soporte de cromatografía para unir agentes de TSE, (b) asegurar procedimientos de desinfección eficaces de geles reciclados y (c) garantizar una eliminación de PrP^{Sc} coherente con respecto a ciclos de producción (Thyer 3, Prion-removal capacity of chromatographic and ethanol precipitation steps used in the production of albumin and immunoglobulins; Vox Sang., noviembre de 2006; 91 (4): 292-300).

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

40 El documento WO-A-03/105911 desvela un método de limpieza de plasma humano por medios convencionales de cromatografía de intercambio iónico usando un gradiente salino para elución.

45 El documento WO-A-94/08686 desvela un proceso para llevar a cabo, de una forma consecutiva, diferentes notas de separación cromatográfica en una columna de cromatografía líquida usando un medio de separación individual.

D.B. Brimacombe *et al.*, en Biochem. J. (1999) 342, 605-613 desvela la purificación de recPrP mediante dos etapas de cromatografía sucesivas. La primera etapa es una cromatografía de intercambio catiónico (gradiente de NaCl de 150-650) realizada en S-Sefarosa. Los eluatos combinados de interés se sometieron a una segunda etapa de cromatografía (Sefarosa de quelación cargada con cinc; gradiente de imidazol 0-100 mM).

50 P.R. Foster *et al.*, Vox Sanguinis 2000; 78: 86-95 desvela la eliminación de proteína priónica en la fabricación de productos de plasma con muchas etapas. Este método comprende 4 cromatografía de intercambio iónico (Etapas 2, 11, 13 y 15) y una cromatografía por afinidad (heparina inmovilizada sobre Sefarosa-FF; Etapa 12) realizada en diferentes columnas en geles de cromatografía diferentes.

60 T. Burnouf *et al.*, publica en Transfusion Clinique et Biologique 13 (2006) 320-328, el alcance de la eliminación de agente TSE durante varias etapas de cromatografía de factores de coagulación obtenidos a partir de plasma. La publicación se centra en diversas (principalmente etapas de cromatografía de intercambio iónico usadas en la producción de FVIII (DEAE-Toyopearl 650M), vWF (DEAE-Toyopearl 650M), fibrinógeno (DEAE-Toyopearl 650M), complejo de protrombina/FIX (DEAE-celulosa), PCC (DEAE-Sefarosa), FIX (DEAE-Sefarosa o Heparina-Sefarosa) y trombina (S-Sefarosa). Todos estos sistemas se investigaron por separado.

65 J. Thyer *et al.*, en Vox Sanguinis (2006) 91, 292-300, informar sobre la reducción de PrP sobre DEAE-Sefarosa, CM-Sefarosa y columnas de cromatografía Macro-Prep High Q ("Materiales y Métodos"; Fig. 1, página 294; Tabla 1). En otro experimento se desvela el uso secuencial de una columna de DEAE-Sefarosa y una columna de CM-Sefarosa

de Macro-Prep.

Un objeto de la invención fue proporcionar un proceso de cromatografía que eliminara PrP^{Sc} durante los procesos de fraccionamiento de fuentes que estaban potencialmente contaminadas con PrP^{Sc}, tales como fuentes obtenidas por vía biológica. El proceso debería evitar los inconvenientes de la técnica anterior. Otro objeto fue diseñar un proceso que pudiera hacer que el proceso de purificación fuera fiable y permitir la regeneración de los soportes de cromatografía.

Se desvela un proceso para aislamiento y purificación de una proteína diana por cromatografía en el que la cromatografía elimina o agota priones (PrP^{Sc}) que comprende las etapas de

- poner en contacto una muestra de PrP^{Sc} potencialmente contaminada que comprende una proteína diana con un material de cromatografía multimodal;
- establecer las condiciones del tampón de modo que la proteína diana se una al material de cromatografía multimodal y PrP^{Sc} no se una al material de cromatografía multimodal;
- seguido de elución de la proteína diana, y
- recogida de la proteína diana.

Sumario de la invención

De acuerdo con la invención se proporciona un proceso para aislamiento y purificación de una proteína diana mediante cromatografía, en el que la cromatografía elimina o agota priones (PrP^{Sc}), comprendiendo dicho proceso las etapas de:

- poner en contacto una muestra de PrP^{Sc} potencialmente contaminada que comprende una proteína diana con una resina de cromatografía multimodal individual, en el que dicha resina de cromatografía multimodal individual comprende un soporte sólido al que un ligando de ácido 2-(benzoilamino) butanoico con carga negativa se une a través de un grupo de unión, en el que el grupo de unión comprende un átomo de azufre, y en el que dicha resina de cromatografía multimodal individual puede interactuar con dicha proteína diana a través de una combinación de interacciones hidrófobas e iónicas, en el que dichas interacciones hidrófobas se pueden producir a través del grupo benzoilamino del ligando de ácido 2-(benzoilamino) butanoico con carga negativa y/o el grupo de unión; establecer las condiciones del tampón de modo que la proteína diana se une a la resina de cromatografía multimodal individual y mientras que PrP^{Sc} no se una a la resina de cromatografía multimodal individual; y
- seguido de elución de la proteína diana de dicha resina de cromatografía multimodal individual.

Esto proporciona una mejora significativa porque la resina de cromatografía se une a la PrP^{Sc} con menos fuerza, permitiendo la eliminación de la PrP^{Sc} de la resina de cromatografía antes de eluir la proteína diana.

De acuerdo con la divulgación "aislamiento y purificación" se refiere en particular a procesos que se usan al menos para enriquecer cualquier sustancia similar a proteína deseada o procesos que eliminan sustancias no deseadas. De acuerdo con la divulgación podría ser ventajoso para producir el producto deseado tan puro como sea posible.

La expresión "proteína diana" se refiere a una proteína de interés que se debería aislar y/o purificar libre de PrP^{Sc}. La proteína diana también puede ser además una mezcla de proteínas si se desea de ese modo, por ejemplo una mezcla de diferentes factores que tengan un efecto biológico cuando se trabaja en un conjunto.

Los "priones" son sustancias proteicas infecciosas.

Descripción detallada de la invención

De forma sorprendente se encontró que una resina de cromatografía individual era capaz de minimizar la unión de PrP^{Sc} al gel en condiciones de cromatografía y por lo tanto conseguir valores de reducción excelentes para el producto que se une a la misma. Esta resina está disponible en el mercado y se describe por ejemplo en el documento WO-A-2004/024318. La resina que ha mostrado que tiene este efecto con respecto a PrP^{Sc} se denomina resina multimodal (o modo mixto o inducción con carga hidrófoba). Por el contrario, por ejemplo los medios de cromatografía convencionales tales como intercambiadores iónicos y resinas de cromatografía de interacción hidrófoba, que funcionan solamente a través de un principio, las resinas multimodales funcionan a través de una combinación de interacciones iónicas e interacciones hidrófobas. Un ejemplo de una resina de este tipo está disponible en el mercado como Capto® MMC en la compañía GE Healthcare.

En lo sucesivo se describe la resina de cromatografía multimodal.

Se desvela una resina de cromatografía multimodal individual que es un adsorbente eficaz para su uso en separación y aislamiento de una diversidad de sustancias biológicas. La resina de cromatografía multimodal de la presente divulgación se puede usar, por ejemplo, en técnicas preparativas, tales como cromatografía en columna, Y en dispositivos analíticos, tales como biochips. Una ventaja de la presente resina de cromatografía multimodal que se describe en el presente documento es su selectividad y especificidad elevadas para sustancias biológicas tales como inmunoglobulinas, junto con la evitación de procesos de limpieza de costes elevados y a menudo perjudiciales necesarios para sustratos de la técnica anterior. Una segunda ventaja es que la resina de cromatografía multimodal de la presente divulgación se adapta casi de forma ideal para su uso con muestras biológicas a pH y fuerza iónica fisiológicos, evitando de ese modo la necesidad de ajuste del pH y la adición de sales liotrópicas como se prescribe en la técnica anterior. Como tercera ventaja se puede contemplar la capacidad elevada de los presentes sustratos, que, en vista del bajo coste de los reactivos usados para preparar los, presenta ganancias económicas significativas con respecto al uso de adsorbentes especializados de la técnica anterior.

Ligando en Modo Mixto

La resina de cromatografía multimodal individual de la presente divulgación comprende un soporte sólido al que un ligando de ácido 2-(benzoilamino) butanoico con carga negativa se une a través de un grupo de unión que comprende un átomo de azufre. Dicha resina de cromatografía multimodal individual puede interactuar con la proteína diana a través de una combinación de interacciones hidrófobas e iónicas. Dichas interacciones hidrófobas se pueden producir a través del grupo benzoilamino del ligando de ácido 2-(benzoilamino) butanoico con carga negativa y/o el grupo de unión.

El soporte sólido se adapta de forma ideal para adsorber sustancias biológicas tales como inmunoglobulinas a fuerza iónica y pH fisiológicos.

El término "sustituido", como se usa en el presente documento, se refiere a la unión directa o indirecta de un grupo sulfato, sulfonato, fosfato, o fosfonato al grupo ácido 2-(benzoilamino) butanoico. La unión indirecta se puede producir a través de un grupo espaciador, que es un grupo alquileo C_{1-6} lineal o ramificado. El grupo ácido 2-(benzoilamino) butanoico se une al soporte sólido mediante un grupo de unión, que comprende un resto que contiene mercapto, éter, o amino. Sujeto a consideraciones estructurales que se describen a continuación, es preferente que el grupo de unión sea hidrófobo, confiriendo de ese modo un carácter hidrófobo al soporte sólido a un pH en el que la unión de una sustancia biológica se produce a través de interacciones tanto de electrostáticas como hidrófobas. Los restos hidrófobos incluyen, pero no se limitan a, grupos alquileo C_{1-6} lineales o ramificados, grupos alquilenilo C_{2-6} , y grupos alquilenilo C_{2-6} . Los restos particularmente útiles son etileno y propileno. Otros restos hidrófobos comprenden un grupo aromático, como se ha descrito anteriormente, para formar, por ejemplo, fenetileno. Por lo tanto los restos mencionados anteriormente se interrumpen no se protegen con al menos un resto mercapto, éter, o amino. En realizaciones en las que el grupo ácido 2-(benzoilamino) butanoico no comprende un átomo de azufre, el grupo de unión contiene preferentemente un resto mercapto. En este sentido, el grupo de unión confiere caracteres hidrófobo y tiófilo a la resina de cromatografía multimodal.

La hidrofobia del grupo de unión se puede adaptar fácilmente mediante la introducción de sustituyentes polares, tales como hidroxilo, un haluro, o nitro; mediante oxidación de un resto mercapto con métodos conocidos; mediante la incorporación de restos éter o amino en el grupo de unión; o combinaciones de los mismos.

En otra realización preferente, el propio grupo de unión comprende un polisacárido tal como hidroxietil-celulosa, almidón, amilosa, o agarosa. En este contexto un polisacárido preferente es dextrano. Por lo tanto, el soporte sólido se modifica con un polisacárido, que se puede derivatizar con un grupo de unión como se describe a continuación.

Sin limitarse a sí mismos a ninguna teoría en particular, los inventores creen que la resina de cromatografía multimodal de la presente divulgación funciona a través de "modos mixtos" de interacción entre la resina de cromatografía multimodal y una sustancia biológica. El grupo ácido 2-(benzoilamino) butanoico tiene un valor de pK inferior a 4 y, por lo tanto, tiene carga negativa dentro de los intervalos de pH de uso como se ha descrito anteriormente. Una sustancia biológica, tal como una inmunoglobulina, se pone en contacto con la resina de cromatografía multimodal entre aproximadamente pH 4 y pH 6, intervalo en el que la sustancia biológica lleva una carga neta positiva o neutra. En este intervalo de pH, la sustancia biológica se une a la resina de cromatografía multimodal a través de uno o más tipos de interacciones con los grupos ácido 2-(benzoilamino) butanoico. Las interacciones incluyen atracciones de Coulomb y asociaciones hidrófobas ligeras. Cuando el pH aumenta por encima de 8, la sustancia biológica gana una carga negativa neta, creando de ese modo una repulsión electrostática entre la resina de cromatografía multimodal con carga negativa y la sustancia biológica con carga negativa. En consecuencia, la sustancia biológica se libera mediante la repulsión electrostática de la resina de cromatografía multimodal y a continuación se puede aislar. Se cree que estas fuerzas iónicas repulsivas son mayores que las fuerzas de atracción más débiles que se han indicado anteriormente.

Resina de cromatografía multimodal

La presente divulgación contempla un soporte sólido al que el ligando de ácido 2-(benzoilamino) butanoico con carga

negativa se une a través de un grupo de unión, en el que el grupo de unión comprende un átomo de azufre. En particular se contemplan dos formatos diferentes. En un formato, el soporte sólido se encuentra en la forma que se usa por lo general para medios de cromatografía, es decir, una perla o partícula. Estas perlas o partículas se derivatizan con el ligando de ácido 2-(benzoilamino) butanoico. Las perlas o partículas forman un medio de cromatografía que alguien puede usar para empaquetar la columna. En otro formato, al soporte sólido adquiere la forma de un chip, es decir, un soporte sólido que tiene una superficie generalmente plana a la que se puede unir el ligando en modo mixto, por vía covalente o de otro modo. Los chips que se adaptan para unirse a una superficie de contacto que sonda de un dispositivo de detección también se denominan "sondas".

10 Perlas y Partículas

De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, la resina de cromatografía multimodal comprende en primer lugar un soporte sólido, que puede comprender un material orgánico. Los materiales orgánicos a modo de ejemplo son polisacáridos, tales como celulosa, almidón, goma de agar, agarosa, y dextrano. Se contemplan polímeros sintéticos hidrófilos, que incluyen poli(acrilamidas sustituidas o no sustituidas, polimetacrilamidas, poli(acrilatos, polimetacrilatos, polímeros hidrófilos de polivinilo, poliestireno, polisulfona, y copolímeros de estireno y divinilbenceno. Como alternativa, los materiales inorgánicos se pueden usar como el material de soporte sólido. Los materiales inorgánicos de este tipo incluyen, pero no se limitan a, materiales minerales porosos, tales como sílice; hidrogel que contiene sílice, circonia, titania, alúmina; y otros materiales cerámicos. También es posible usar mezclas de estos materiales, o materiales compuestos formados por copolimerización de o mediante una red interpenetrada de dos materiales, tales como los que se desvelan en los documentos US-A-5.268,097, US-A-5.234.991, y US-A-5,075.371.

El soporte sólido se puede presentar en forma de perlas o partículas irregulares de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1,000 mm de diámetro. Como alternativa, el soporte sólido se puede presentar en forma de fibras, membranas, o materiales similares a esponjas permeadas con orificios en los tamaños de micrómetros a milímetros.

El grupo ácido 2-(benzoilamino) butanoico que se ha descrito anteriormente se inmoviliza por vía química en el soporte sólido mediante la formación de enlaces covalentes entre el soporte sólido y el grupo de unión, ti entre el grupo de unión y el grupo ácido 2-(benzoilamino) butanoico. En escenarios habituales, al soporte sólido se trata en primer lugar con un reactivo bifuncional que sirve para introducir, sobre un soporte sólido, grupos reactivos que forman parte o la totalidad del grupo de unión. Para algunos soportes sólidos, tales como celulosa, materiales compuestos que contienen un hidrogel, u otros materiales que presentan grupos hidroxilo, a menudo es ventajoso desprotonar los grupos hidroxilo con una fuente de hidróxido, por ejemplo, antes de la reacción con un reactivo bifuncional. El reactivo bifuncional es capaz de reaccionar tanto con el soporte sólido como con reactivos que contienen el grupo ácido 2-(benzoilamino) butanoico. Los reactivos bifuncionales ilustrativos, que contienen los mismos grupos funcionales o diferentes grupos funcionales, incluyen, pero no se limitan a, epíclorhidrina, epibromhidrina, dibromo- y dicloropropanol, dibromobutano, etilenglicol diglicidiléter, butanodiol diglicidiléter, divinil sulfona, alilidiglicidiléter, y bromuro de alilo.

Una vez funcionalizado, el soporte sólido se lava a continuación de forma minuciosa con uno o más disolventes para retirar el reactivo bifuncional que no ha reaccionado, productos secundarios de reacción, o ambos. En este sentido un disolvente habitual usado es el agua.

El grupo ácido 2-(benzoilamino) se introduce a continuación por medio de reactivos que contienen los grupos mencionados sustituidos con grupos mercapto, hidroxilo, o amino. Los reactivos de este tipo reaccionan con grupos funcionales presentados por el soporte sólido funcionalizado como se ha descrito anteriormente.

El emparejamiento particular de un reactivo bifuncional con un reactivo de ácido 2-(benzoilamino) butanoico va dirigido por químicas bien conocidas. Por ejemplo, los soportes sólidos que se funcionalizan con epóxidos pueden experimentar reacciones con reactivos que contienen mercapto, hidroxilo, o amino para formar un sustrato con grupos de unión que contienen etileno. Otros soportes sólidos modificados con bromuro de alilo, por ejemplo, presentan grupos alqueno que pueden reaccionar directamente con reactivos que contienen mercapto. Como alternativa, los grupos alqueno se pueden bromar adicionalmente para formar adecuadamente derivados de bromo reactivo.

La concentración de grupos ácidos 2-(benzoilamino) butanoico inmovilizados puede variar entre una fracción de un micromol a varios cientos de micromoles por mililitro de soporte sólido, dependiendo de la concentración de reactivo bifuncional usado para preparar el soporte sólido.

Las concentraciones bajas del grupo inmovilizado por lo general dan como resultado una baja capacidad de separación de la resina de cromatografía multimodal, mientras que las concentraciones elevadas por lo general conducen a un aumento de la capacidad.

Como se ha descrito anteriormente, existen varias ventajas al tener una resina que elimina la PrP^{sc}, que principalmente no se une a la PrP^{sc}, una que sea posible lavar de forma minuciosa con la resina con diferentes

composiciones de tampón antes de eluir el producto, lo que hace posible agotar la PrP^{sc} de diferentes composiciones bioquímicas hasta un nivel muy bajo o para eliminar la PrP^{sc} de las composiciones. Por ejemplo es posible lavar la resina con diferentes tipos de tampones de lavado, incluyendo tampones de salinidad de elevada a respectivamente baja para interrumpir la interacción de iónica a respectivamente hidrófoba en la que cantidades más pequeñas de los priones se pueden unir a la resina o incluso al producto, antes de eluir el producto. También son ejemplos detergentes, alcoholes y aminoácidos, que se pueden añadir a los tampones de lavado para conseguir una pureza óptima antes de eludir el producto. Es significativamente más difícil realizar etapas de lavado similares para otros tipos de medios de cromatografía "convencionales" tales como por ejemplo diferentes tipos de resinas de intercambio iónico en las que la PrP^{sc} se une a la resina. Incluso si la afinidad de unión es significativamente más elevada en comparación con el producto siempre habrá un riesgo de que la PrP^{sc} en cierto grado se coeluya a partir de la resina junto con el producto. Por lo tanto existe una gran ventaja con el uso de una resina en la que el producto se una "de forma multimodal" a la resina a la vez que la PrP^{sc} tiene una afinidad relativamente baja con respecto a la resina, lo que hace posible aplicar etapas de lavado apropiadas antes de la elución del producto.

15 De acuerdo con la invención la proteína diana se eluye después de la elución de PrP^{sc} por ejemplo mediante

- la corrección de la fuerza iónica del tampón de elución aumentando o disminuyendo la fuerza iónica,
- la adición de alcoholes al tampón de elución - en particular en solución acuosa - tales como mono- o dihidroxialcanoles, por ejemplo alcoholes alifáticos inferiores tales como metanol, etanol, propanol, y/o
- la corrección del valor de pH del tampón de elución aumentando o disminuyendo el pH.

También se puede usar una combinación de las técnicas de elución que se han descrito. Por ejemplo, la invención usa un aumento de la fuerza iónica un aumento de la cantidad de etilenglicol.

También se puede usar otras condiciones de elución, tales como un aumento de la concentración de aminoácidos, un aumento de las concentraciones con sales específicas de acuerdo con la "serie de Hofmeister".

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

35 El valor de reducción de la proteína priónica en la fracción de proteína que comprende la proteína diana es de > 1 a $4 \lg(10)$, tal como se calcula a partir de la cantidad que se aplicó inicialmente la resina. El valor analítico del prión en la fracción de proteína de interés está por debajo del límite de detección del prión en un ensayo de transferencia de Western.

40 En una realización de la presente invención las condiciones de cromatografía comprenden al menos dos de las siguientes etapas:

- i) Emplear un tampón de carga y uno de equilibrio que contiene un disolvente y/o un detergente no iónico;
- 45 ii) Emplear un tampón de lavado sin un disolvente y/o un detergente no iónico;
- iii) Emplear un tampón de lavado que contiene un alcohol y/o un aminoácido;
- iv) Emplear un tampón de lavado que contiene una concentración de sal elevada;
- 50 v) Emplear un tampón de lavado que contiene una concentración de sal baja;
- vi) Emplear un tampón que contiene una combinación de alcohol y concentración de sal elevada.

55 En una realización adicional de la presente invención las condiciones de cromatografía comprenden al menos dos de las siguientes etapas:

- i) Emplear un tampón de carga y uno de equilibrio que contiene un disolvente y/o un detergente no iónico;
- 60 ii) Emplear un primer tampón de lavado que es un tampón sin un disolvente y un detergente no iónico;
- iii) Emplear un segundo tampón de lavado que contiene un alcohol y un aminoácido;
- iv) Emplear un tercer tampón de lavado que contiene una concentración de sal elevada;
- 65 v) Emplear un cuarto tampón de lavado que contiene una concentración de sal baja;

- vi) Emplear un tampón de elución que contiene una combinación de un alcohol y concentración de sal elevada.

En otra realización de la invención los tampones usados son los que siguen a continuación

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

En una realización adicional de la presente invención las condiciones de cromatografía comprenden al menos dos de las siguientes etapas:

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

En otra realización de la invención los tampones usados son los que siguen a continuación

- 40 i) Tampón de carga y equilibrio que contiene fosfato de tri-n-butilo y/o Triton x-100 en una concentración que varía de un 0,8 - 1,2 % (p/p);
- ii) Lavar con > 20 volúmenes de columna de un segundo tampón de lavado que contiene etilenglicol y/o lisina/arginina que varía de un 18-22 % (p/p) de EG y 0,4-0,6 M de lisina/arginina;
- 45 iii) Lavar con > 20 volúmenes de columna de un tercer tampón de lavado que contiene cloruro sódico en una concentración que varía de 0,8-1,2 M;
- iv) Lavar con > de que volúmenes de columna de un cuarto tampón de lavado que contiene cloruro sódico en una concentración que varía de 0,08-0,12 M;
- 50 v) El tampón de elución contiene etilenglicol y/o cloruro sódico en una concentración que varía de un 45-55 % (p/p) para EG y 1,3-1,7 de NaCl.
- 55

La ventaja de la aplicación de tampones de lavado de diferentes tipos es que esto aumenta la posibilidad de eliminar los priones de diferentes tipos y que se una debido a diferentes interacciones a la resina o la proteína diana. También aumentando la cantidad de los respectivos tampones de lavado (es decir, un volumen de columna es igual al volumen de la resina) la seguridad de cualquiera de los priones restantes de "acción lenta" en el tampón aplicado, puede aumentar.

60

De acuerdo con la invención la resina de cromatografía multimodal contiene

un ligando de ácido 2-(benzoilamino) butanoico con carga negativa.

65

También se desvela una fracción con agotamiento de proteína priónica de una proteína diana aislada y purificada a

partir de fuentes que contienen proteína potencialmente infecciosa cuando se obtiene de acuerdo con el proceso de la invención.

5 En particular la proteína diana aislada y purificada de acuerdo con el proceso de la invención se selecciona entre el grupo que consiste en proteínas plasmáticas, hormonas peptídicas, factores de crecimiento, citoquinas y proteínas inmunoglobulinas policlonales, proteínas plasmáticas seleccionadas entre factores de coagulación sanguínea humanos y animales que incluyen fibrinógeno, protrombina, trombina, complejo de protrombina, FX, FXa, FIX, FIXa, FVII, FVIIa, FXI, FXIa, FXII, FXIIa, FXIII y FXIIIa, factor de von Willebrand, proteínas de transporte que incluyen albúmina, transferrina, ceruloplasmina, haptoglobina, hemoglobulina y hemopexina, inhibidores de proteasa que incluyen β -antitrombina, α -antitrombina, α 2-macroglobulina, inhibidor de CI, inhibidor de la ruta de factor tisular (TFPI), cofactor II de heparina, inhibidor de proteína C (PAI-3), Proteína C y Proteína S, proteínas inhibidoras de α -1 esterasa, α -1 antitripsina, proteínas antiangiogénicas que incluyen antitrombina latente, proteínas altamente glicosiladas que incluyen glicoproteína α -1-ácida, antiqumotripsina, inhibidor de inter- α -tripsina, glicoproteína α -2-HS y proteína C reactiva y otras proteínas que incluyen glicoproteína rica en histidina, lectina de unión a manano, proteína de unión a C4, fibronectina, GC-globulina, plasminógeno, factores sanguíneos tales como eritropoyetina, interferón, factores tumorales, tPA, γ CSF.

Ejemplos

20 Ejemplo 1

Columna y Resina

25 Una columna Tricorn (GE Healthcare, Suecia, área de sección transversal: 0.2 cm², diámetro de 0,5 cm) se empaquetó con resina Capto MMC (GE Healthcare N.º de Cat. 17-5317-10, lote N.º 308581), altura del lecho de 9 cm. volumen de la columna: 1,8 ml.

Material de partida

30 Como material de partida se usó una mezcla de proteínas obtenidas a partir de proteína recombinante de células HEK 293 y concentrada en una etapa de columna de captura (número de lote: BPP 047 SP para eluato, 117 μ g de proteína /ml).

35 Composiciones del tampón*

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

NaCl 0,3 M, CaCl₂ 0,01 M (2 x H₂O), L-Histidina 0,01 M, Triton X-100 al 1 % en p/p, TNBP al 0,3 % en p/p, pH: 7,0 \pm 0,1, Conductividad: 29 \pm 3 mS/cm² a +25 °C

40

Tampón 2 (Tampón de equilibrio sin S/D)

NaCl 0,3 M, CaCl₂ 0,01 M (2 x H₂O), L-Histidina 0,01 M, Tween 80 al 0,02 % (p/p),

45 pH: 6,5 \pm 0,1, Conductividad: 31 \pm 3 mS/cm² a +25 °C

Tampón 3 (Lavado 1: Lisina y Etilenglicol (= EG))

NaCl 0,3 M, CaCl₂ 0,01 M (2 x H₂O), L-Histidina 0,01 M

50

Tween 80 al 0,02 % (p/p), monocloruro de L-Lisina 0,5 M, Etilenglicol (= EG) al 20 % (p/p)

pH: 6,5 \pm 0,1, Conductividad: 37 \pm 3 mS/cm² a +25 °C.

55 Tampón 4 (Lavado 2: Lavado con Alto contenido de Sal)

NaCl 1,0 M, CaCl₂ 0,05 M (2 x H₂O), L-Histidina 0,05 M, Tween 80 al 0,02 % (p/p),

60 pH: 6,5 \pm 0,1, Conductividad: 89 \pm 5 mS/cm² a +25 °C.

Tampón 5 (Lavado 3: Lavado con Bajo contenido de Sal)

NaCl 0,1 M, CaCl₂ 0,01 M (2 x H₂O), L-Histidina 0,01 M, Tween 80 al 0,02 % (p/p)

65 pH: 6,5 \pm 0,1, Conductividad: 13 \pm 3 mS/cm² a +25 °C.

Tampón 6 (Tampón de elución)

NaCl 1,5 M, CaCl₂ 0,02 M (2 x H₂O), L-Histidina 0,02 M, Tween 80 al 0,02 % (p/p)

5 Etilenglicol (EG) al 50 % (p/p), pH: 6,5 ± 0,1 (ajustar el pH antes de la adición de EG)

Conductividad: 39 ± 3 mS/cm² a +25 °C, medido después de la adición de EG.

Tampón 7 (Tampón de regeneración)

10

Hidróxido Sódico 1 M

Para ajuste del pH:

15 HCl 1 M

*Los tampones se prepararon en relación a 1 kg que Agua añadida en lugar de 1 l como un volumen final. Esto tendrá un impacto pequeño en las molaridades finales, ya que los aditivos aumentarán ligeramente el volumen final.

20 Condiciones de cromatografía:

Tabla 1: Resumen de las cantidades aproximadas de tampón aplicado, caudales expresados como ml/min así como cm/hora. También se muestra el tiempo necesario para cada etapa del tampón y tiempo de contacto con el gel para la solución de proteína.

25

Desarrollo de Cpto MMC						
Volumen de columna = (ml) Bloque	1,8 N.º CV	ml	Flujo ml/min	Flujo cm/h	Tiempo (min)	Tiempo de contacto (min)
Tampón de equilibrio + SD	5	9	1,00	306	9	1,8
Alimentación de muestra	27	48	1,00	306	48	1,8
Equilibrio - SD	10	18	1,00	306	18	1,8
Lisina + lavado con EG	20	35	0,60	183	59	2,9
Lavado con alto contenido de sal	10	18	1,00	306	18	1,8
Lavado con bajo contenido de sal (flujo ascendente de partida)	5	9	1,00	306	9	1,8
Tampón de elución, NaCl 1,5 M	7	12	0,20	61	62	8,8

Resina de MMC, empaquetada en una columna Tricorn con una altura del lecho de aprox. 9 cm. La etapa de cromatografía semana dictó para conductividad y a 280 nm. La carga de proteína fue de aproximadamente 3 mg con respecto a 1 ml de resina.

30

En primer lugar, la columna se equilibró de forma apropiada con tampón de equilibrio que contenía agentes químicos de S/D hasta que se obtuvo una línea de base estable. El material de partida se añadió a los agentes químicos S/D a una proporción de 14 g de solución de reserva de S/D por kg para obtener la misma concentración que el tampón de equilibrio, esto se agitó durante al menos 10 minutos antes de la aplicación de la solución de proteína a la columna. Las fracciones de los siguientes hampones se recogieron y se analizaron para proteína total (y priones en los experimentos de PrP^{Sc} adiciones). El perfil de cromatografía medido a una absorbancia de 280 nm se puede observar en el apéndice 2:

35

- Flujo continuo (Tampón 1 + proteínas)

40

- Tampón 1 (Tampón con alto contenido de detergente no iónico; NaCl 0,3 M, CaCl₂ 0,01 M, L-Histidina 0,01 M, Triton X-100 al 1 % en p/p, TNBP al 0,3 % en p/p, pH: 7,0)

ES 2 671 026 T3

- Tampón 2 (Tampón con bajo contenido de detergente no iónico; NaCl 0,3 M, CaCl₂ 0,01 M, L-Histidina 0,01 M, Tween 80 al 0,02 % (p/p) a pH 6,5)
- 5 • Tampón 3 (Tampón de Aminoácido / Alcohol; NaCl 0,3 M, CaCl₂ 0,01 M, L-Histidina 0,01 M, Tween 80 al 0,02 % (p/p), monocloruro de L-Lisina 0,5 M, Etilenglicol al 20 % (p/p), pH 6,5)
- Tampón 4 (Tampón con alto contenido de sal; NaCl 1,0 M, CaCl₂ 0,05 M, L-Histidina 0,05 M, Tween 80 al 0,02 % (p/p), pH: 6,5)
- 10 • Tampón 5 (Tampón con bajo contenido de sal; NaCl 0,1 M, CaCl₂ 0,01 M, L-Histidina 0,01 M, Tween 80 al 0,02 % (p/p) pH: 6,5)
- Tampón 6 (Tampón con alto contenido de sal / alto contenido de Alcohol), NaCl 1,5 M, CaCl₂ 0,02 M, L-Histidina 0,02 M, Tween 80 al 0,02 % (p/p), Etilenglicol (EG) al 50 % (p/p) , pH: 6,5
- 15 • Tampón 7 (Tampón de Regeneración; NaCl 2 M).

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

Resultados

Tabla 2 (Detección de Proteína total en experimentos sin priones)

Muestra	Volumen de muestra (ml)	Proteína Total µg/ml	Proteína Total mg	Proteína Total %
Material de partida (Muestra de carga)	47	117	5,5	100
Flujo continuo (Tampón 1)	40	na	na	na
Tampón 2	20	na	na	na
Tampón 3	40	17,9	0,7	13 %
Tampón 4	20	10,7	0,2	4 %
Tampón 5	10	13,6	0,1	2 %
Tampón 6	9	150	1,4	25 %
Tampón 7	18	na	na	na

na = no analizado debido a interferencia de tampón con el método analítico de proteína total

Ejemplo 2 (experimento de adición de priones)

Para poder determinar la eliminación de proteína priónica del procedimiento de cromatografía que se ha descrito en el ejemplo 1, se realizó un experimento de adición de priones. Se usó la misma columna, resina, tampones y material de partida al igual que en el Ejemplo 1.

Material de partida para infección con proteína priónica

En este experimento se usó una fracción microsómica/citosólica de la cepa 263K de tembladera adaptada a hámster.

Aproximadamente 54 g del material de partida de proteína (el mismo que en el ejemplo 1; número de lote: eluato de BPP 047 SP) que contenía 117 µg/ml de proteína, se les congelaron en un baño con agua a 25 °C y se calentó hasta una temperatura de 24,0 °C (diana: 20-25 °C). A continuación se pesaron 51,12 g (diana: 50 ± 2 g) de material de partida y se hicieron adiciones con 2,6 ml (diana: 2,5 ± 0,2 ml) de fracción microsómica/citosólica hasta una concentración final de un 5,1 %. Se comprobó que el pH del material de partida con adiciones era 6,994 (diana: 7,0 ± 0,1). A continuación se extrajo una alícuota de 6 ml, se tomaron alícuotas y se almacenó a ≤ -60 °C (material de partida con adiciones de muestra - SSM).

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

Etapa de cromatografía

Una columna Tricorn de 1,8 ml de GE Healthcare empaquetada con resina Cpto MMC (CV = 1,0 ml, altura del lecho = 9 cm) se equilibró con 8,3 CV de Tampón 1 (Tampón de equilibrio con S/D) a un caudal de 1,0 ml/min (diana: 5 CV a 1,0 ml/min). A continuación se cargaron 47,29 g de material de partida con adiciones tratado con S/D sobre la columna, aplicando un caudal de 1,0 ml/min (diana: 45 ± 2 g a 1,0 ml/min). Después de la carga, la columna se lavó abundantemente con 10,0 CV de Tampón 2 (Tampón de Equilibrio sin S/D) a un caudal de 0,8 ml/min (diana: 10 CV a 1,0 ml/min). La recogida del flujo continuo comenzó cuando la señal de UV empezó a aumentar y continuó hasta que la absorbancia comenzó a disminuir. El peso de la fracción de flujo continuo se determinó (peso real: 48,23 g), se extrajo una alícuota de 16 ml, se tomaron alícuotas y se almacenó a ≤ -60 °C (flujo continuo de la muestra-FT). La fracción de lavado 1 se recogió durante el lavado abundante con el Tampón 2. Se determinó que el peso real de esta fracción era de 12,75 g y se extrajo una alícuota de 12 ml y se almacenó a ≤ -60 °C (lavado de muestra 1-W1).

A continuación la columna se lavó con 22,2 CV de Tampón 3 (lavado con Lisina y Etilenglicol) a un caudal de 0,6 ml/min (diana: 20 CV a 0,6 ml/min). Durante el lavado con el Tampón 3, la fracción de lavado 2 se recogió y se determinó que el peso real de esta fracción era de 40,35 g. Se extrajo una alícuota de 16 ml, y se almacenó a ≤ -60 °C (lavado de la muestra 2-W2).

Durante el lavado de la columna con 10,0 CV de Tampón 4 (lavado con alto contenido de sal) a un caudal de 0,9 ml/min (diana: 10 CV a 1,0 ml/min), se recogió la fracción de lavado 3. Se determinó un peso real de 18,48 g, a continuación se extrajo una alícuota de 16 ml, se tomaron alícuotas y se almacenó a ≤ -60 °C (lavado de muestra 3-W3).

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

A continuación el producto se eluyó con 8,3 CV de Tampón 6 (Tampón de Elución), aplicando un caudal de 0,2 ml/min (diana: 7 CV a 0,2 ml/min). La recogida del eluato se realizó durante todo el periodo de lavado abundante de la columna con Tampón 6. Se determinó que el tesoro real de la fracción de eluato era de 13,54 g, se extrajo una alícuota de 12,5 ml y se almacenó a ≤ -60 °C (eluato de muestra-E).

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

Tabla 3 (Resultados del experimento con adición de priones)

Muestra	Volumen de la muestra (ml)	Contenido de PrP ^{Sc} Log ₁₀	Contenido de PrP ^{Sc} %
Material de partida (muestra -SSM).	54	4,67	100
Flujo continuo, Tampón 1 (muestra -FT)	48	4,68	102
Tampón 2 (muestra - W1).	13	3,61	9,5
Tampón 3 (muestra - W2)	40	2,61	0,9
Tampón 4 (muestra - W3)	18	< 1,27	< 0,04
Tampón 5 (muestra - W4)	12	< 1,09	< 0,03
Tampón 6 (muestra - E)	14	< 1,13	< 0,03
Tampón 7 (muestra - Reg)	18	< 1,26	< 0,04

Discusión

- 5 Como se puede observar a partir de la Tabla 3 y el apéndice 1 (figura 1-5) se pueden observar valores excelentes de eliminación de proteína priónica para las fracciones de Tampón 4-7. Por lo tanto los productos de proteína, que eluyen dentro de estas fracciones podrían tener márgenes de seguridad muy buenos con respecto a la eliminación de PrP^{Sc}. Lo que también es muy importante es que el equilibrio de masa de la proteína priónica aplicada indica que no se va a encontrar PrP^{Sc} en absoluto en otras fracciones que en el flujo continuo y en el tampón de lavado temprano. Para el conocimiento de los investigadores, esto no se ha mostrado anteriormente en la técnica anterior.
- 10

En los ejemplos publicados de resinas de cromatografía como etapa de eliminación de proteína priónica, incluso si se consiguen valores de reducción de proteína priónica relativamente aceptables, las proteínas priónicas se pueden encontrar normalmente en varias fracciones, tanto antes como después de preocuparse de la fracción de producto, lo que indica un riesgo de contaminación cruzada.

5

Descripción del análisis

Determinación de proteína total de acuerdo con Bradford

- 10 La determinación de proteína de acuerdo con Bradford se basa en la observación de que la absorbancia máxima para una solución ácida de Azul Brillante de Coomassie G-250 se desplaza de 465 nm a 595 nm cuando se produce la unión a la proteína. Las interacciones tanto hidrófobas como iónicas estabilizan la forma aniónica del colorante, produciendo un cambio de color visible. El ensayo es útil grado que el coeficiente de extinción de la solución de complejo de colorante-albúmina es constante con respecto a un intervalo de concentración es de 10 veces. Para más información véase también Bradford, MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. 1976.
- 15

Ensayo de Transferencia de Western para la Detección de PrP^{Sc}

- 20 El ensayo de transferencia de Western es una determinación semicuantitativa de proteína priónica asociada a Tembladera resistente a proteinasa K (PrP^{Sc}).

El ensayo de transferencia de Western se realizó como se describe por DC Lee *et al.*, *Journal of Virological Methods* 2000; 84: 77-89.

25

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para aislamiento y purificación de una proteína diana mediante cromatografía, en el que la cromatografía elimina o agota los priones (PrP^{Sc}), comprendiendo dicho proceso las etapas de:

- poner en contacto una muestra potencialmente contaminada con PrP^{Sc} que comprende una proteína diana con una resina de cromatografía multimodal individual, en el que dicha resina de cromatografía multimodal individual comprende un soporte sólido al que un ligando de ácido 2-(benzoilamino) butanoico con carga negativa se une a través de un grupo de unión, en el que el grupo de unión comprende un átomo de azufre, y en el que dicha resina de cromatografía multimodal individual puede interactuar con dicha proteína diana a través de una combinación de interacciones hidrófobas e iónicas, en el que dichas interacciones hidrófobas se pueden producir a través del grupo benzoilamino del ligando de ácido 2-(benzoilamino) butanoico con carga negativa y/o el grupo de unión; establecer las condiciones del tampón de modo que la proteína diana se une a la resina de cromatografía multimodal individual y mientras que PrP^{Sc} no se une a la resina de cromatografía multimodal individual; y
- seguido por elución de la proteína diana de dicha resina de cromatografía multimodal individual.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la proteína diana se diluye después de la elución del prión mediante

- la corrección de la fuerza iónica del tampón de elución aumentando o disminuyendo la fuerza iónica,
- la adición de alcoholes al tampón de elución - en particular en solución acuosa - tales como mono- o dihidroxialcanoles, por ejemplo alcoholes alifáticos inferiores tales como metanol, etanol, propanol, y/o
- la corrección del valor de pH del tampón de elución aumentando o disminuyendo el pH.

3. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el valor de eliminación de la proteína priónica en la fracción de proteína que comprende la proteína diana es de > 1 a 4 lg(10), tal como se calcula a partir de la cantidad que se aplicó inicialmente a la resina.

4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el valor analítico de la proteína priónica en la fracción de proteína de interés está por debajo del límite de detección del ensayo de transferencia de Western de priones.

5. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que las condiciones de cromatografía comprenden al menos dos de las siguientes etapas:

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

6. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que las condiciones de cromatografía comprenden al menos dos de las siguientes etapas:

- i) Emplear un tampón de carga y uno de equilibrio que contiene un disolvente y/o un detergente no iónico;
- ii) Emplear un primer tampón de lavado que es un tampón sin un disolvente y un detergente no iónico;
- iii) Emplear un segundo tampón de lavado que contiene un alcohol y un aminoácido;
- iv) Emplear un tercer tampón de lavado que contiene una concentración de sal elevada;
- v) Emplear un cuarto tampón de lavado que contiene una concentración de sal baja;
- vi) Emplear un tampón de elución que contiene una combinación de un alcohol y concentración de sal elevada.

7. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que:

- 5
- ii) El segundo tampón de lavado contiene etilenglicol y/o lisina/arginina que varía de aproximadamente un 5 a aproximadamente un 30 % (p/p) de etilenglicol y de 0,2 a aproximadamente 1,5 M de lisina/arginina;
- 10
- iii) El tercer tampón de lavado contiene cloruro sódico en una concentración que varía de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4 M, en particular de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 M;
- iv) El cuarto tampón de lavado contiene cloruro sódico en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,2, en particular de 0,01 a aproximadamente 0,1 M;
- 15
- v) El tampón de elución contiene etilenglicol y/o cloruro sódico en una concentración que varía de aproximadamente un 25 a aproximadamente un 75 % (p/p), en particular de aproximadamente un 25 a aproximadamente un 50 % de etilenglicol y NaCl de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4 M.

20

8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la proteína diana se selecciona entre el grupo que consiste en proteínas plasmáticas, hormonas peptídicas, factores de crecimiento, citoquinas y proteínas inmunoglobulinas policlonales, proteínas plasmáticas seleccionadas entre factores de coagulación sanguínea humanos y animales que incluyen fibrinógeno, protrombina, trombina, complejo de protrombina, FX, FXa, FIX, FIXa, FVII, FVIIa, FXI, FXIa, FXII, FXIIa, FXIII y FXIIIa, factor de von Willebrand, proteínas de transporte que incluyen albúmina, transferrina, ceruloplasmina, haptoglobina, hemoglobulina y hemopexina, inhibidores de proteasa que incluyen β -antitrombina, α -antitrombina, α 2-macroglobulina, inhibidor de CI, inhibidor de la ruta de factor tisular (TFPI), cofactor II de heparina, inhibidor de proteína C (PAI-3), Proteína C y Proteína S, proteínas inhibidoras de la α -1 esterasa, α -1 antitripsina, proteínas antiangiogénicas que incluyen antitrombina latente, proteínas altamente glicosiladas que incluyen glicoproteína α -1-ácida, antiquimotripsina, inhibidor de inter- α -tripsina, glicoproteína α -2-HS y proteína C reactiva y otras proteínas que incluyen glicoproteína

25

30

rica en histidina, lectina de unión a manano, proteína de unión a C4, fibronectina, GC-globulina, plasminógeno, factores sanguíneos tales como eritropoyetina, interferón, factores tumorales, tPA, γ CSF.