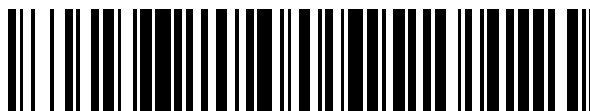


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 250**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2013 PCT/CN2013/075405**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14094406**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2013 E 13864364 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2937359**

54 Título: **Procedimiento cromatográfico para aislar y purificar albúmina sérica humana recombinante de alta pureza**

30 Prioridad:

21.12.2012 CN 201210559390

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

24.10.2018

73 Titular/es:

**WUHAN HEALTHGEN BIOTECHNOLOGY CORP
(100.0%)
No.666 Gaoxin Avenue,
East Lake High-Tech Development
Zone Wuhan, Hubei 430079, CN**

72 Inventor/es:

**YANG, DAICHANG;
SHI, BO;
SHI, QIANNI;
OU, JIQUAN y
LIU, JINGRU**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 687 250 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

Procedimiento cromatográfico para aislar y purificar albúmina sérica humana recombinante de alta pureza

5 Campo de la invención

La invención pertenece al campo de la biotecnología y, en particular, se refiere a un procedimiento para aislar y purificar albúmina sérica humana recombinante de alta pureza (OsrHSA) para aplicación clínica.

10 Antecedentes de la invención

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

En la actualidad, la HSA para uso clínico se prepara principalmente extrayéndola y aislándola del plasma humano. Sin embargo, esta estrategia de preparación tiene las siguientes desventajas: por un lado, la fuente de plasma es insuficiente, es decir, el limitado suministro de sangre no es capaz de satisfacer las demandas de producción de HSA y las preparaciones relevantes de la misma; por otro lado, la propia sangre puede ser potencialmente un factor de riesgo, por ejemplo, puede contener patógenos infecciosos peligrosos tales como el virus de la hepatitis, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), etc., lo que provoca una enorme preocupación acerca de la aplicación de HSA extraída de plasma.

Con el desarrollo de las modernas técnicas de síntesis y ADN recombinante, los investigadores se toman un profundo interés en la producción y aplicación de albúmina sérica humana recombinante (OsrHSA) Hasta ahora, se han intentado usar diversos sistemas de expresión para la producción en masa de OsrHSA. Por ejemplo, procariotas tales como *E. coli* (Latta, M. y col., Bio/Technology, 5:1309-1314,(1987)), *Bacillus subtilis* (Saunders, C. W. y col., J. Bacteriol. 169: 2917-2925, (1987)), eucariotas tales como levaduras (WO 00/44772,EP0683233A2,US 5612196) y se han usado cultivos de células animales para la producción de OsrHSA. Sin embargo, tales estrategias no son adecuadas para su producción industrial debido al bajo nivel de expresión o el alto coste de producción.

La solicitud de patente china n.º 201010606635.8 y la solicitud WO12083580de los presentes inventores desvelan un procedimiento para extraer OsrHSA a partir de arroz. En base al procedimiento, la presente invención estudia además el procedimiento para eliminar endotoxina de la OsrHSA y mejorar la pureza de la proteína > 99,9999 %, obteniendo de ese modo esta solución técnica novedosa de la presente invención. Lin y col., Journ. Chrom. B: Biomed. Sc. and Appl., 2005desvelan el uso de alcohol para eliminar lipopolisacárido (LPS) en un procedimiento de purificación de proteínas recombinantes. La solicitud WO05003152también desvela el uso de alcohol para eliminar LPS usando cromatografía de intercambio aniónico. Burnouf y col., Journ. Biomed. Biophys meth., 2001desvelan la purificación de proteínas plasmáticas, tales como albúmina, e indican que la albúmina puede obtenerse combinando fraccionamiento con etanol y cromatografía.

50 Resumen de la invención

Un objetivo es proporcionar un procedimiento cromatográfico para aislar y purificar albúmina sérica humana recombinante de alta pureza a partir de extracto de proteína bruta de semillas de arroz transgénicas. La pureza de la albúmina sérica humana recombinante obtenida puede alcanzar el 99,9999 %. El contenido de endotoxina cumple con los estándares de albúmina sérica humana estipulados en la farmacopea china.

La invención se presenta en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. La solución técnica de la presente invención implica:

Un procedimiento cromatográfico para aislar y purificar albúmina sérica humana recombinante de alta pureza

(OsrHSA), que comprende las etapas siguientes de:

- 1) someter extracto bruto de albúmina sérica humana recombinante a cromatografía de intercambio catiónico, añadiendo un alcohol en un tampón para eliminar la endotoxina, para obtener producto primario I;
- 5 2) someter el producto primario I a cromatografía de intercambio aniónico para obtener producto secundario II;
- 3) someter el producto secundario II a cromatografía de interacción hidrofóbica para obtener el producto objetivo, albúmina sérica humana recombinante de alta pureza.

La cromatografía de interacción hidrofóbica se realiza en una resina seleccionada de entre Phenyl Sepharose HP,
10 Phenyl Sepharose FF, Phenyl Bestarose HP o Phenyl Bestarose FF.

Específicamente, el alcohol según el procedimiento de la presente invención es etanol.

Específicamente, el tampón según el procedimiento de la presente invención comprende un tampón de lavado, un
15 tampón de equilibrio I y un tampón de equilibrio II; donde el tampón de lavado comprende etanol anhidro al 10-20 % en volumen, el tampón de equilibrio I comprende etanol anhidro al 0-10 % en volumen y el tampón de equilibrio II comprende etanol anhidro al 5-15 % en volumen.

Preferiblemente, el tampón de lavado comprende etanol anhidro al 15 % y el tampón de equilibrio II comprende
20 etanol anhidro al 10 %. Más preferiblemente, el tampón de lavado comprende 2 g/L de acetato sódico anhidro y etanol anhidro al 15 %; la conductividad se ajusta con NaCl a 83 mS/cm y el pH se ajusta a 4,6-5,0 con ácido acético. El tampón de equilibrio I comprende: 2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, el pH se ajusta a 4,2-4,8 con ácido acético. El tampón de equilibrio II comprende: 2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, etanol anhidro al 10 %, el pH se ajusta a 4,2-4,8 con ácido acético.

25

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la eficiencia de purificación y la capacidad de carga de la cromatografía sobre Capto-MMC en tres condiciones diferentes;

30 donde, M: marca molecular, L: muestra de extracto, M1: grupo de control, M2: grupo de ensayo 1, M3: grupo de ensayo 2; FT: fracción de flujo a través de la muestra cargada; M3FT: fracción de flujo a través del grupo de ensayo M3, 600, 660 y 730 corresponden a la fracción de flujo a través de la muestra cargada de 600 mL, 660 mL y 730 mL, respectivamente; lavado: fracción de lavado de impurezas que contiene OsrHSA; Elución: fracción de elución que contiene OsrHSA.

35 La Fig. 2 muestra la comparación de pureza de la purificación primaria realizada sobre Capto MMC y Bestarose Diamond MMC;

donde, GE-MMC: Capto-MMC; Best-MMC: Bestarose Diamond MMC; Elu: fracción de elución procedente de la purificación primaria realizada sobre las dos resinas; M: marca molecular; FT: fracción de flujo a través de la muestra cargada; lavado: fracción de lavado de impurezas que contiene OsrHSA; Elu: fracción de elución que contiene
40 OsrHSA; S: muestra de extracto; CIP1: fracción de elución de la regeneración de resina 1; CIP2: fracción de elución de la regeneración de resina 2.

La Fig. 3 muestra la comparación de la eficiencia de purificación de la cromatografía sobre UNO Sphere S con o sin adición de alcohol;

45 donde, CK: grupo de control; UE: grupo de ensayo (se añadió etanol al 10 % en la muestra y el tampón de equilibrio); M: marca molecular; Carga: muestra; FT: fracción de flujo a través de la muestra cargada; Elución: fracción de elución recogida que contiene la proteína objetivo en dos condiciones; CIP: regeneración de resina.

La Fig. 4 muestra la comparación de la SDS-PAGE de la purificación secundaria realizada sobre Capto-Adhere y Bestarose Diamond MMA en condiciones de flujo a través;

50 donde, M: marca molecular; MMC: muestra; FT: fracción de flujo a través que contiene OsrHSA, CIP: regeneración de resina.

La Fig. 5 muestra la comparación de la purificación secundaria realizada sobre Capto-Adhere y Bestarose Diamond MMA en condiciones de unión;

donde, M: marca molecular; L: muestra; FT: fracción de flujo a través que contiene OsrHSA, Elu: fracción de elución que contiene OsrHSA; C: regeneración de resina.

55 La Fig.6 muestra la comparación de la cromatografía de interacción hidrofóbica realizada sobre Phenyl Sepharose HP y Phenyl Bestarose HP como purificación final;

donde, M: marca molecular; Ad: muestra cargada; FT: fracción de flujo a través que contiene OsrHSA; CIP: regeneración de resina.

60 La Fig. 7 muestra la imagen de la detección de impurezas antes y después de la purificación de proteína en las semillas de arroz;

donde, Izquierda: imagen comparativa de la SDS-PAGE de la detección de impurezas antes y después de la purificación de albúmina sérica humana en las semillas de arroz; Derecha: imagen de detección por inmunoelectrotransferencia de la hibridación con anticuerpo de impureza total de semillas de arroz antes y después de la purificación de la albúmina sérica humana en las semillas de arroz; M: marca molecular.

5 La Fig. 8 muestra la imagen de la SDS-PAGE de la OsrHSA purificada según un ejemplo de la presente invención; donde, A: cromatografía en Capto-MMC; B: cromatografía en Capto-Adhere; C: cromatografía en Phenyl HP; L: muestra cargada; FT: fracción de flujo a través; W: fracción de lavado de impurezas; Elu: fracción de elución; C: regeneración de resina.

La Fig. 9 muestra la imagen de la SDS-PAGE (izquierda) y la imagen de la inmunoelectrotransferencia correspondiente (derecha) de la OsrHSA purificada según otro ejemplo de la presente invención;

10 donde, A: cromatografía en Capto-MMC; B: cromatografía en Capto-Adhere; C: cromatografía en Phenyl HP; M: marca molecular; L: muestra cargada; FT: fracción de flujo a través; W: fracción de lavado de impurezas; E: fracción de elución; C: regeneración de resina.

15 Descripción detallada de la invención

Las características y ventajas de la presente descripción se describirán con más detalle junto con los dibujos adjuntos. A menos que se especifique lo contrario, los materiales y reactivos usados en los ejemplos siguientes fueron los comercializados habitualmente.

20

[Ejemplo 1] Preparación de extracto de OsrHSA

Se preparó arroz transgénico que contenía OsrHSA según el procedimiento de la patente china n.º 200510019084.4 y se extrajo la OsrHSA a partir de las semillas de arroz transgénicas según el procedimiento de la patente china n.º

25 201010606635.8 para obtener extracto de OsrHSA pura.

[Ejemplo 2] Selección de condiciones para la cromatografía de intercambio catiónico como purificación primaria

30 Procedimiento: consúltese el procedimiento de la solicitud de patente china n.º 201010606635.8; Grupos: grupo de ensayo y grupo de control

1. Cromatografía de intercambio catiónico realizada sobre Capto MMC como purificación primaria y procedimiento para eliminar endotoxina con alcohol

35 Se utilizó resina Capto MMC para realizar la cromatografía de intercambio catiónico como cromatografía primaria y se añadió etanol al tampón del grupo de ensayo para eliminar la endotoxina, pero no se añadió etanol al grupo de control (M1).

Grupo de ensayo 1 (M2): El tampón de equilibrio y la muestra se añadieron con etanol al 10 % en volumen y el procedimiento concreto fue:

Empaquetado de la columna: se empaquetaron aproximadamente 30 mL de resina Capto MMC en una columna cromatográfica XK16/400 mm y, a continuación, se lavó con NaOH 0,5 N durante 30 min para matar los pirógenos;

45 Equilibrado: se equilibró la columna con 200 mL de tampón de equilibrio (2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, etanol anhidro al 10 % (v/v), se ajustó a pH 4,5 con ácido acético) hasta que el pH alcanzó 4,5 y estuvo en la línea base;

Carga de la muestra: se añadió la muestra de extracto puro que contenía OsrHSA con etanol anhidro al 10 % (v/v) y 11 g/L de NaCl y se utilizó NaOH para ajustar el pH a 4,5; la muestra se cargó a una velocidad de flujo de 600 cm/h, la conductividad de la muestra fue 20-21 mS/cm, el pH fue 4,5.

Reequilibrado: tras cargar la muestra, se reequilibró la columna cromatográfica con 100 mL de tampón de equilibrio (2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, etanol anhidro al 10 % (v/v), se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético, se preparó con agua para inyección) a una velocidad de flujo de 300 cm/h.

55

Lavado de impurezas: se utilizaron 200 mL de tampón de lavado (2 g/L de acetato sódico anhidro, 58,5 g/L de NaCl, se ajustó el pH a 4,8 con ácido acético, se preparó con agua para inyección) para eluir las impurezas a una velocidad de flujo de 300 cm/h;

60 Elución: se utilizó tampón de elución (2,67 g/L de dihidrogenofosfato sódico, 2,82 g/L de hidrogenofosfato disódico,

23,4 g/L de NaCl, pH 6,3-6,4, se preparó con agua para inyección) para eluir la proteína objetivo, obteniendo la fracción que contenía OsrHSA.

Grupo de ensayo 2 (M3): El tampón de equilibrio y la muestra se añadieron con etanol al 10 %, el tampón de lavado de impurezas se añadió con etanol al 20 % y el procedimiento concreto fue:

Empaquetado de la columna: se empaquetaron aproximadamente 30 mL de resina Capto MMC en una columna cromatográfica XK16/400 mm (altura de lecho: 21 cm) y, a continuación, se lavó con NaOH 0,5 N durante 30 min para matar los pirógenos;

Equilibrado: se equilibró la columna con 200 mL de tampón de equilibrio (2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, etanol anhidro al 10 % (v/v), se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético) a una velocidad de flujo de 300 cm/h hasta que el pH alcanzó 4,5 y estuvo en la línea base;

Carga de la muestra: Se añadió la muestra de extracto puro que contenía OsrHSA con etanol anhidro al 10 % (v/v) y 11 g/L de NaCl, se ajustó el pH a 4,5 con NaOH. La muestra se cargó a una velocidad de flujo de 600 cm/h. La conductividad de la muestra fue 20-21 mS/cm y el pH fue 4,5;

Reequilibrado: tras cargar la muestra, se reequilibró la columna cromatográfica con 100 mL de tampón de equilibrio (2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, etanol anhidro al 10 % (v/v), se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético, se preparó con agua para inyección) a una velocidad de flujo de 300 cm/h.

Lavado de impurezas: se utilizaron 200 mL de tampón de lavado (2 g/L de acetato sódico anhidro, 120 g/L de NaCl, se ajustó el pH a 4,8 con ácido acético, se preparó con agua para inyección) para eluir las impurezas a una velocidad de flujo de 300 cm/h;

Elución: se utilizó tampón de elución (2,67 g/L de dihidrogenofosfato sódico, 2,82 g/L de hidrogenofosfato disódico, 23,4 g/L de NaCl, pH 6,3-6,4, se preparó con agua para inyección) para eluir la proteína objetivo, obteniendo la fracción que contenía OsrHSA.

Resultados: los resultados de la determinación de la pureza y capacidad de carga se muestran en la Fig. 1. No hubo diferencias evidentes de pureza entre el grupo de control y los dos grupos experimentales. La adición de alcohol en el tampón de lavado fue favorable para eliminar las bandas de pureza de 17-26 KD. La adición de alcohol en el tampón de lavado no influyó en la capacidad de carga de Capto-MMC. La FT de los tres grupos mostró que la capacidad de carga de cada grupo era superior a 30 mL de extracto/mL de resina.

Endotoxina: Como se muestra en la Tabla 1, la adición de alcohol en el tampón de lavado de la cromatografía sobre Capto-MMC tuvo una buena eficiencia de eliminación de endotoxina. Cuando se añadieron el tampón de equilibrio y el tampón de extracción con etanol al 10 % (v/v) y se añadió el tampón de lavado con etanol al 20 %, la cromatografía sobre Capto-MMC tuvo la mejor eficiencia de eliminación de endotoxina, que fue de 3,6 veces la del grupo de control.

Tabla 1 Comparación del contenido de endotoxina de la cromatografía sobre Capto-MMC que contiene un alcohol en el tampón de lavado

Grupo	Extracto (UE/mL)	UE totales de la muestra cargada	Fracción recogida (UE/mL)	UE totales de la fracción recogida	N.º de veces de reducción de las UE totales
Grupo de control (M1)		3×10^5	400-600	$1,25 \times 10^4$	24
Grupo de ensayo 1 (M2)	1500-2000	$3,3 \times 10^5$	100-200	$4,5 \times 10^3$	76
Grupo de ensayo 2 (M3)		$3,7 \times 10^5$	100-200	$4,3 \times 10^3$	87

2. Optimización del procedimiento de eliminación de endotoxina mediante cromatografía sobre Capto MMC con un alcohol añadido en el tampón

2.1 Se comparó la eficiencia de eliminación de endotoxina con o sin adición de un alcohol en la muestra de extracto y el procedimiento concreto fue:

Grupo de control 1 (M1): El tampón de equilibrio y la muestra de extracto se añadieron con etanol al 10 % y el tampón de lavado se añadió con etanol al 20 %, el procedimiento concreto fue:

Empaquetado de la columna: se empaquetaron aproximadamente 29 mL de resina Capto MMC en una columna cromatográfica BioRad 15/400 mm y, a continuación, se lavó con NaOH 0,5 N durante 30 min para matar los pirógenos;

10

Equilibrado: se equilibró la columna con 200 mL de tampón de equilibrio I (2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, etanol anhidro al 10 % (v/v), se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético) a una velocidad de flujo de 300 cm/h hasta que el pH alcanzó 4,5 y estuvo en la línea base;

15 Carga de la muestra: se añadió la muestra de solución de extracto puro que contenía OsrHSA con etanol anhidro al 10 % (v/v) y 11 g/L de NaCl, se ajustó el pH a 4,5 con NaOH; se cargaron 870 mL de muestra a una velocidad de flujo de 600 cm/h, la conductividad de la muestra fue 20-21 mS/cm, el pH fue 4,5; el contenido de endotoxina en la muestra fue de 1000-2000 UE/mL;

20 Reequilibrado: tras cargar la muestra, se reequilibró la columna cromatográfica con 100 mL de tampón de equilibrio II (2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, etanol anhidro al 10 % (v/v), se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético, se preparó con agua para inyección) a una velocidad de flujo de 300 cm/h;

Lavado de impurezas: se utilizaron 200 mL de tampón de lavado (2 g/L de acetato sódico anhidro, etanol anhidro al 20 % (v/v), se ajustó una conductividad de 83 mS/cm con NaCl, se ajustó el pH a 4,8 con ácido acético, se preparó con agua para inyección) para eluir las impurezas a una velocidad de flujo de 300 cm/h;

Elución: se utilizó tampón de elución (2,67 g/L de dihidrogenofosfato sódico, 2,82 g/L de hidrogenofosfato disódico, 23,4 g/L de NaCl, pH 6,3-6,4, se preparó con agua para inyección) para eluir la proteína objetivo, obteniendo la fracción que contenía OsrHSA.

Grupo de ensayo (M2): Ni la muestra de extracto ni el tampón de equilibrio I se añadieron con etanol. Tras cargar la muestra, se equilibró la columna cromatográfica con 150 mL de tampón de equilibrio II que contenía etanol al 10 % (aproximadamente 5 Vc), el tampón de lavado se añadió con etanol al 20 %; las otras condiciones fueron las mismas que las del grupo M1.

Los resultados se muestran en la Tabla 2. La reducción de las UE totales fue básicamente idéntica en los dos grupos de ensayo paralelo. La muestra de extracto y el tampón de equilibrio con o sin alcohol no tuvieron un efecto evidente sobre la eliminación de endotoxina. Hubo poca diferencia en la concentración y el volumen de la fracción recogida entre los dos grupos y el contenido de endotoxina fue el mismo. Esto demostró además que se puede conseguir la misma eficiencia de eliminación de endotoxina incluso aunque no haya alcohol en la muestra y el tampón de equilibrio I.

Tabla 2: Comparación de la endotoxina de la cromatografía sobre Capto-MMC cuando la muestra y el tampón de equilibrio I tenían o no tenían alcohol

Grupo de ensayo	Muestra cargada (mL)	UE totales de la muestra cargada	Fracción recogida (mL)	Endotoxina de la fracción recogida (UE/mL)	UE totales de la fracción recogida	n.º de veces de reducción
M1	870	$1,31 \times 10^6$	95	200-400	$2,4 \times 10^4$	55
M2	870	$1,31 \times 10^6$	100	200-300	$2,5 \times 10^4$	53

2.2 Comparación de la eficiencia de eliminación de endotoxina cuando se añadieron diferentes cantidades de un alcohol en el tampón de lavado

Grupo de control 1 (M1):

Empaquetado de la columna: se empaquetaron aproximadamente 29 mL de resina Capto MMC en una columna cromatográfica BioRad 15/400 mm y, a continuación, se lavó la columna con NaOH 0,5 N durante 30 min para matar los pirógenos;

Equilibrado: se equilibró la columna con 200 mL de tampón de equilibrio I (2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético) a una velocidad de flujo de 300 cm/h hasta que el pH alcanzó 4,5 y estuvo en la línea base;

5

Carga de la muestra: se añadió la muestra de extracto puro que contenía OsrHSA con 11 g/L de NaCl, se ajustó el pH a 4,5 con NaOH; se cargaron 650 mL de muestra a una velocidad de flujo de 600 cm/h, la conductividad de la muestra fue 20-21 mS/cm, el pH fue 4,5, el contenido de endotoxina en la muestra fue de 1000-2000 UE/mL;

10 Reequilibrado: tras cargar la muestra, se reequilibró la columna cromatográfica con 150 mL de tampón de equilibrio II (2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, etanol anhidro al 10 % (v/v), se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético, se preparó con agua para inyección) a una velocidad de flujo de 300 cm/h;

Lavado de impurezas: se utilizaron 200 mL de tampón de lavado (2 g/L de acetato sódico anhidro, etanol anhidro al 20 % (v/v), se ajustó una conductividad de 83 mS/cm con NaCl, se ajustó el pH a 4,8 con ácido acético, se preparó con agua para inyección) para eluir las impurezas a una velocidad de flujo de 300 cm/h;

15 Elución: se utilizó tampón de elución (2,67 g/L de dihidrogenofosfato sódico, 2,82 g/L de hidrogenofosfato disódico, 23,4 g/L de NaCl, pH 6,3-6,4, se preparó con agua para inyección) para eluir la proteína objetivo, obteniendo la fracción que contenía OsrHSA.

20 Grupo de ensayo 1 (M2): Con la excepción de que se añadió etanol anhidro al 15 % (v/v) en el tampón de lavado, las condiciones fueron las mismas que las del grupo M1.

25 Grupo de ensayo 2 (M3): Con la excepción de que se añadió etanol anhidro al 10% (v/v) en el tampón de lavado, las condiciones fueron las mismas que las del grupo M1.

Los resultados se muestran en la Tabla 3.

30 Tabla 3 Comparación del contenido de endotoxina cuando se añadieron diferentes cantidades de alcohol en el tampón de lavado

Grupo de ensayo	UE totales de la muestra cargada	Fracción recogida (mL)	Endotoxina de la fracción recogida (UE/mL)	UE totales de la fracción recogida	n.º de veces de reducción
M1	$1,17 \times 10^6$	78	200-300	$1,9 \times 10^4$	62
M2	$1,17 \times 10^6$	90	200-300	$2,25 \times 10^4$	52
M3	$1,17 \times 10^6$	88	300-400	$3,08 \times 10^4$	38

Como se muestra en la Tabla 3, las UE totales de endotoxina en el grupo M3 presentaron una reducción de 38 veces y supusieron una diferencia significativa en comparación con el grupo M1 (grupo de control); se añadió etanol al 15 % en el grupo M2, las UE totales de endotoxina en el grupo M2 presentaron una reducción de 52 veces; el contenido de endotoxina de la fracción recogida en el grupo M2 fue el mismo que el del grupo M1 y no presentó una diferencia evidente en comparación con el grupo M1 (grupo de control). La concentración de etanol en el tampón de lavado de MMC se puede reducir hasta aproximadamente el 15 %, lo cual no tuvo una influencia evidente sobre la eficiencia de eliminación de endotoxina.

40

2.3 Eficiencia de la eliminación de endotoxina cuando el tampón de lavado contenía alcohol isopropílico

Grupo de control (CK): Empaquetado de la columna: se empaquetaron aproximadamente 29 mL de resina Cpto MMC en una columna cromatográfica BioRad 15/400 mm y, a continuación, se lavó con NaOH 0,5 N durante 30 min para matar los pirógenos;

45 Equilibrado: se equilibró la columna con 200 mL de tampón de equilibrio I (2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético) a una velocidad de flujo de 300 cm/h hasta que el pH alcanzó 4,5 y estuvo en la línea base;

50

Carga de la muestra: se cargaron 900 mL de muestra a una velocidad de flujo de 600 cm/h y la conductividad de la muestra fue de 5-8 mS/cm, el pH fue 4,5, el contenido de endotoxina en la muestra fue de 1000-2000 UE/mL;

Reequilibrado: tras cargar la muestra, se reequilibró la columna cromatográfica con 150 mL de tampón de equilibrio

II (2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, etanol anhidro al 10 % (v/v), se ajustó el pH a 4,6-4,7 con ácido acético, se preparó con agua para inyección) a una velocidad de flujo de 300 cm/h;

5 Lavado de impurezas: se utilizaron 200 mL de tampón de lavado (2 g/L de acetato sódico anhidro, se ajustó una conductividad de 82-89 mS/cm con NaCl, etanol anhidro al 15 % (v/v), se ajustó el pH a 4,7-4,9 con ácido acético, se preparó con agua para inyección) para eluir las impurezas a una velocidad de flujo de 300 cm/h;

10 Elución: se utilizó tampón de elución (2,67 g/L de dihidrogenofosfato sódico, 2,82 g/L de hidrogenofosfato disódico, 23,4 g/L de NaCl, pH 6,3-6,4, se preparó con agua para inyección) para eluir la proteína objetivo, obteniendo la fracción que contenía OsrHSA.

Grupo de ensayo 1 (M1): Empaquetado de la columna: se empaquetaron aproximadamente 29 mL de resina Cpto MMC en una columna cromatográfica BioRad 15/400 mm y, a continuación, se lavó con NaOH 0,5 N durante 30 min para matar los pirógenos;

15 Equilibrado: se equilibró la columna con 200 mL de tampón de equilibrio I (2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético) a una velocidad de flujo de 300 cm/h hasta que el pH alcanzó 4,5 y estuvo en la línea base;

20 Carga de la muestra: se cargaron 900 mL de muestra a una velocidad de flujo de 600 cm/h y la conductividad de la muestra fue de 5-8 mS/cm, el pH fue 4,5, el contenido de endotoxina en la muestra fue de 1000-2000 UE/mL; Reequilibrado: tras cargar la muestra, se reequilibró la columna cromatográfica con 150 mL de tampón de equilibrio II (2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, alcohol isopropílico al 4-6 % (v/v), se ajustó el pH a 4,6-4,7 con ácido acético, se preparó con agua para inyección) a una velocidad de flujo de 300 cm/h;

25 Lavado de impurezas: se utilizaron 200 mL de tampón de lavado (2 g/L de acetato sódico anhidro, alcohol isopropílico al 10-11 % (v/v), se ajustó una conductividad de 82-89 mS/cm con NaCl, se ajustó el pH a 4,7-4,9 con ácido acético, se preparó con agua para inyección) para eluir las impurezas a una velocidad de flujo de 300 cm/h;

30 Elución: se utilizó tampón de elución (2,67 g/L de dihidrogenofosfato sódico, 2,82 g/L de hidrogenofosfato disódico, 23,4 g/L de NaCl, pH 6,3-6,4, se preparó con agua para inyección) para eluir la proteína objetivo, obteniendo la fracción que contenía OsrHSA.

35 Grupo de ensayo 2 (M2): Con la excepción de que el tampón de equilibrio II se añadió con alcohol isopropílico al 10-11 % (v/v) en lugar de alcohol isopropílico al 4-6 % (v/v), el tampón de lavado se añadió con alcohol isopropílico al 15-16 % (v/v) en lugar de alcohol isopropílico al 10-11 % (v/v) y la conductividad se redujo a 75-76 mS/cm, las condiciones fueron las mismas que las del grupo M1.

Los resultados se muestran en la Tabla 4.

40 Tabla 4 Comparación de la eficiencia de eliminación de endotoxina cuando se añadió alcohol isopropílico en el tampón de lavado

Grupo	UE totales de la muestra cargada	Fracción recogida (mL)	Endotoxina de la fracción recogida (UE/mL)	UE totales de la fracción recogida	n.º de veces de reducción
CK	$8,9 \times 10^5$	110	100-200	$1,7 \times 10^4$	52
M1	$7,2 \times 10^5$	110	10-20	$1,6 \times 10^3$	450
M2	$8,0 \times 10^5$	112	5-10	$1,1 \times 10^3$	710

45 Como se muestra en la Tabla 4, las UE totales de endotoxina en el grupo de control presentaron una reducción de 52 veces y las del grupo M1 y el grupo M2 presentaron una reducción de 450 veces y 710 veces, respectivamente. La eficiencia de eliminación de endotoxina mejoró significativamente en comparación con el procedimiento en el que se añadió etanol en el tampón de lavado. En el grupo M2, se añadió alcohol isopropílico al 15 % (v/v) y el contenido de endotoxina presentó una reducción de 710 veces, la eficiencia de eliminación de endotoxina de este fue comparable a la del grupo M1. Esto demostró que la cantidad de alcohol isopropílico añadida en el tampón de equilibrio podía ser del 4-11 % (v/v), la cantidad de alcohol isopropílico añadida en el tampón de lavado podía ser del 50 10-16 % (v/v) y no había un efecto evidente sobre la eliminación de endotoxina cuando la conductividad estaba en el intervalo de 75-89 mS/cm.

3. Selección de la resina cromatográfica para la cromatografía de intercambio catiónico y eficiencia de eliminación de

endotoxina con un alcohol añadido en el tampón de lavado

3.1 Se utilizó Bestarose Diamond MMC para realizar la cromatografía de intercambio catiónico y se eliminó la endotoxina añadiendo un alcohol en el tampón. El procedimiento concreto fue:

- 5
Empaquetado de la columna: se empaquetaron aproximadamente 33 mL de resina Bestarose Diamond MMC en una columna cromatográfica BioRad 15/400 mm y, a continuación, se lavó con NaOH 0,5 N durante 30 min para matar los pirógenos;
- 10 Equilibrado: se equilibró la columna con 200 mL de tampón de equilibrio I (2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético) a una velocidad de flujo de 300 cm/h hasta que el pH alcanzó 4,5 y estuvo en la línea base;
- Carga de la muestra: se añadió la muestra de solución de extracto puro que contenía OsrHSA con 11 g/L de NaCl,
15 se ajustó el pH a 4,5 con NaOH; se cargaron 600 mL de muestra a una velocidad de flujo de 600 cm/h y la conductividad de la muestra fue de 20-21 mS/cm, el pH fue 4,5, el contenido de endotoxina en la muestra fue de 1500-2000 UE/mL;
- 20 Reequilibrado: tras cargar la muestra, se reequilibró la columna cromatográfica con 150 mL de tampón de equilibrio II (2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, etanol anhidro al 10 % (v/v), se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético, se preparó con agua para inyección) a una velocidad de flujo de 300 cm/h;
- Impureza del lavado de impurezas: se utilizaron 200 mL de tampón de lavado (2 g/L de acetato sódico anhidro, etanol anhidro al 15 % (v/v), se ajustó una conductividad de 83 mS/cm con NaCl, se ajustó el pH a 4,8 con ácido
25 acético, se preparó con agua para inyección) para eluir las impurezas a una velocidad de flujo de 300 cm/h;
- Elución: se utilizó tampón de elución (2,67 g/L de dihidrogenofosfato sódico, 2,82 g/L de hidrogenofosfato disódico, 23,4 g/L de NaCl, pH 6,3-6,4, se preparó con agua para inyección) para eluir la proteína objetivo, obteniendo la fracción que contenía OsrHSA.
30
- Resultados: como se muestra en la Fig. 2, la pureza no presentó una diferencia evidente entre las resinas Bestarose Diamond MMC y Capto MMC. Esto demostró que Bestarose Diamond MMC puede reemplazar a la Capto MMC para la purificación primaria de OsrHSA.
- 35 Endotoxina: después de someter la muestra de extracto a purificación primaria sobre resina Bestarose Diamond MMC con un alcohol añadido en el tampón, las UE totales de endotoxina presentaron una reducción de 62 veces, consiguiendo la misma eficiencia de eliminación de endotoxina que la resina Capto MMC.
- 3.2 Cromatografía de intercambio catiónico realizada sobre UNO Sphere S y procedimiento de eliminación de
40 endotoxina con un alcohol añadido en el tampón
- Grupo de control (CK): consúltese el procedimiento de la patente china CN 201010606635.8 de los presentes inventores. La muestra cargada fue de 400 mL.
- 45 Grupo de ensayo (UE), el procedimiento concreto fue:
- Empaquetado de la columna: se empaquetaron aproximadamente 18 mL de resina UNO Sphere S en una columna cromatográfica BioRad 15/200 mm y, a continuación, se lavó con NaOH 0,5 N durante 30 min para matar los pirógenos;
- 50 Equilibrado: se equilibró la columna con 100 mL de tampón de equilibrio (2 g/L de acetato sódico anhidro, etanol anhidro al 10 % (v/v), se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético) a una velocidad de flujo de 300 cm/h hasta que el pH alcanzó 4,5 y fue constante;
- 55 Carga de la muestra: se añadió la muestra de solución de extracto que contenía rHSA con etanol anhidro al 10 % (v/v), se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético; se cargaron 400 mL de la muestra a una velocidad de flujo de 300 cm/h y el contenido de endotoxina en la muestra fue de 800-1000 UE/mL;
- Reequilibrado: tras cargar la muestra, se reequilibró la columna cromatográfica con 60 mL de tampón de equilibrio a
60 una velocidad de flujo de 300 cm/h;

Elución: se utilizó tampón de elución (2 g/L de acetato sódico anhidro, 14,6 g/L de NaCl, se ajustó el pH a 5,5 con ácido acético, se preparó con agua para inyección) para eluir la proteína objetivo, obteniendo la fracción que contenía OsrHSA.

5

Resultados: como se muestra en la Fig. 3, la pureza no presentó una diferencia evidente entre el grupo de control de UNO Sphere S y el grupo de adición de alcohol. Es decir, puede utilizarse la cromatografía sobre resina UNO Sphere S añadiendo un alcohol para la purificación primaria.

- 10 Endotoxina: después de someter la muestra de extracción a purificación primaria sobre resina UNO Sphere S con adición de alcohol, la reducción de las UE totales de endotoxina fue la misma que la del grupo de control. Esto demostró que el alcohol en el tampón de lavado no puede hacer posible que UNO Sphere S tenga una eficiencia de eliminación de endotoxina mejor. Esto puede ser relevante para la propia matriz de resina UNO Sphere S y tanto la resina Capto-MMC como la Bestarose Diamond MMC tienen ligandos multifuncionales complejos y tienen
- 15 propiedades de intercambio catiónico e hidrofóbicas débiles.

[Ejemplo 3] Selección de condiciones para la cromatografía de intercambio aniónico como purificación intermedia

- 20 1. En condiciones de flujo a través de OsrHSA (es decir, en las condiciones de conductividad de 40 mS/cm y pH 7,0, la OsrHSA fluía a través en lugar de unirse a la resina, mientras que las impurezas se unían a la resina y, por tanto, la OsrHSA se separaba de las impurezas). Se realizó la cromatografía de intercambio aniónico sobre Capto-Adhere y Bestarose Diamond MMA.

- 25 Se empaquetaron aproximadamente 40 mL de resina Capto-Adhere en una columna cromatográfica XK16 x 400 mm y la altura de empaquetado fue de 20,5 cm. Se equilibró la columna con aproximadamente 8 Vc de tampón de equilibrio (PB 25 mM, 23,4 g/L de NaCl, pH 7,0) hasta que UV, pH y conductividad alcanzaron la línea base. La muestra de tampón de elución obtenida a partir de cromatografía sobre Capto-MMC o Bestarose Diamond MMC se ajustó a pH 7,0 y se cargaron 288 mL de la muestra a una velocidad de flujo de 300 cm/h. Cuando el valor de
- 30 absorción ultravioleta de la fracción de flujo a través fue > 20 mAU, se recogió la fracción objetivo que contenía OsrHSA. Se tomó la muestra de cada 20 mL de fracción para monitorizar la capacidad de carga y la cantidad total de la muestra cuando la pureza de la fracción de flujo a través no había cambiado de una forma evidente; se calculó la capacidad de carga real de cada mililitro de resina Capto-Adhere a una velocidad de flujo de 300 cm/h.

- 35 En las mismas condiciones de flujo a través de OsrHSA que Capto-Adhere, se realizó el ensayo paralelo sobre resina Bestarose Diamond MMA para comparar el efecto de purificación y la capacidad de carga.

- En las condiciones de flujo a través de OsrHSA, tras la purificación secundaria con las dos resinas aniónicas, la pureza de la CLAR de la proteína objetivo podía llegar a ser superior al 98 %. Como se muestra en la Fig. 4, no hubo
- 40 una diferencia significativa de pureza entre las dos resinas.

2. Cromatografía de intercambio aniónico sobre resina Capto-Adhere en condiciones de unión de OsrHSA

- Las condiciones de unión de OsrHSA significan que la proteína objetivo primero se unió a la resina y parte de las
- 45 impurezas fluyeron a través de la columna y, a continuación, la proteína objetivo se eluyó mediante una sal y un pH concretos para conseguir el efecto de separación y purificación y el enriquecimiento del producto objetivo. Las condiciones incluyeron: la proteína objetivo se unió a la resina de intercambio aniónico en las condiciones de conductividad de 20 mS/cm y pH de 7,0-7,5 y, a continuación, la proteína objetivo se eluyó en las condiciones de conductividad de 40 mS/cm y pH de 7,0-7,2 para eliminar las impurezas y enriquecer la proteína objetivo.

50

- Se empaquetaron aproximadamente 22 mL de resina Capto-Adhere en una columna cromatográfica BioRad 15/200 mm y, a continuación, se equilibró la columna con 220 mL de tampón de equilibrio (1,0 g/L de dihidrogenofosfato sódico, 5,0 g/L de hidrogenofosfato disódico, 5,0 g/L de NaCl, pH 7,5-7,6) a una velocidad de flujo de 300 cm/h hasta que el pH alcanzó 7,5-7,6 y fue estable. Se diluyó la muestra de fracción de elución procedente de la cromatografía
- 55 sobre Capto-MMC o Bestarose Diamond MMC con agua para alcanzar una conductividad de 19-21 mS/cm y se ajustó el pH a 7,0 con NaOH. Se cargaron 150 mL de la muestra a una velocidad de flujo de 300 cm/h. Se reequilibró la columna con 100 mL de tampón de equilibrio. Se eluyó la proteína objetivo con el tampón de elución (1,5 g/L de dihidrogenofosfato sódico, 5,0 g/L de hidrogenofosfato disódico, 23,4 g/L de NaCl, pH 7,1-7,2) a una velocidad de flujo de 300 cm/h, recogiendo la fracción que contenía OsrHSA. El contenido de endotoxina en la fracción recogida
- 60 fue de 100-200 UE/mL.

En las mismas condiciones de unión de OsrHSA que la resina Capto-Adhere, se realizó el ensayo paralelo sobre resina Bestarose Diamond MMA para comparar el efecto de purificación y la capacidad de carga.

5 En las condiciones de unión de OsrHSA, tras la purificación secundaria con resina Capto-Adhere o resina Bestarose Diamond MMA, la pureza de la proteína objetivo podía llegar a ser superior al 99,9 % (resultados de detección mediante ELISA). La resina Bestarose Diamond MMA y la resina capto-Adhere tienen la misma eficiencia de purificación. Los electroforetogramas se muestran en la Fig. 5.

10 3. Selección de condiciones cromatográficas para la cromatografía de intercambio aniónico realizada sobre Capto-Adhere y Bestarose Diamond MMA

Mediante la comparación paralela de las dos resinas Bestarose Diamond MMA y Capto-Adhere, se encontró que, en las mismas condiciones, las dos resinas tenían la eficiencia de purificación y capacidad de carga sustancialmente
15 idénticas sobre la fracción de elución obtenida a partir de la purificación secundaria realizada sobre resina Capto-MMC o Bestarose Diamond MMC, demostrando que pueden utilizarse ambas resinas de cromatografía de intercambio aniónico para la purificación secundaria.

La capacidad de carga de las dos resinas fue superior en condiciones de flujo a través de OsrHSA que en las
20 condiciones de unión de OsrHSA. La capacidad de carga de la primera fue de aproximadamente 25 mg de muestra/mL de resina, mientras que la capacidad de carga de la última fue de 20 mg de muestra/mL de resina. Sin embargo, la eficiencia de purificación en condiciones de unión de OsrHSA fue mejor que en condiciones de flujo a través de OsrHSA. La pureza de la primera podía llegar a ser superior al 99,9 % y la pureza de la última era solo del 98-99 %.

25 En condiciones de unión de OsrHSA, las dos resinas tuvieron mejor eficiencia de eliminación de endotoxina que en condiciones de flujo a través. En condiciones de flujo a través de OsrHSA, la mayoría de la endotoxina fluía a través de la columna junto con la OsrHSA, derivando en una eficacia de eliminación de endotoxina más pobre. Pero en condiciones de unión de OsrHSA, parte de la endotoxina libre fluía a través y otra parte de la endotoxina se unía
30 fuertemente a la resina de tal forma que se podía eluir selectivamente la OsrHSA, derivando en una eficiencia de eliminación de endotoxina mejor.

Teniendo en cuenta diversos factores, es preferible utilizar las condiciones de unión de OsrHSA como las condiciones cromatográficas de las dos resinas de intercambio aniónico, Capto-Adhere y Bestarose Diamond MMA.

35

[Ejemplo 4] Selección de condiciones para la cromatografía hidrofóbica como purificación final

1. Cromatografía hidrofóbica realizada sobre Phenyl Sepharose HP

40 Consultando el procedimiento de la patente china CN201010606635.8 del presente solicitante, se empaquetaron aproximadamente 28 mL de resina Phenyl Sepharose HP en una columna cromatográfica 20 XK16/200 mm y se equilibró la columna con 150 mL de tampón de equilibrado (2,32 g/L de acetato sódico anhidro, 2,81 g/L de dihidrogenofosfato sódico, 2 g/L de octanoato sódico, 66 g/L de sulfato amónico, pH 6,5) a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se añadieron 100 mL de la fracción de elución que contenía OsrHSA obtenida a partir de cromatografía
45 sobre Capto-Adhere o Bestarose Diamond MMA con sulfato amónico para ajustar la conductividad a 75 mS/cm y, a continuación, se añadieron 0,15 g de caprilato sódico y, a continuación, se ajustó el pH a 6,5 con ácido clorhídrico. Se cargó en la columna a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se recogió el flujo a través para obtener la fracción que contenía OsrHSA. Se tomaron las muestras de fracción para determinar la capacidad de carga y calcular la capacidad de carga real de la muestra procedente de la purificación secundaria por mililitro de resina. El
50 electroforetograma se muestra en la Fig. 6.

2. Cromatografía hidrofóbica realizada sobre Phenyl Bestarose HP

Se empaquetaron aproximadamente 24 mL de resina Phenyl Bestarose HP en una columna cromatográfica
55 XK16/200 mm. Se llevó a cabo un ensayo paralelo según el procedimiento mencionado anteriormente en 1 de este ejemplo. Los electrofotogramas se muestran en las Fig. 6 y 7.

Resultados y análisis:

60 después de someter la muestra de fracción obtenida a partir de purificación secundaria con Capto-Adhere o

Bestarose Diamond MMA a cromatografía de interacción hidrofóbica con Phenyl Sepharose HP o Phenyl Bestarose HP, la pureza de la proteína objetivo podía llegar al 99,9999 % (mediante ELISA). No se detectaron proteínas de impureza en la semilla de arroz. Las dos resinas hidrofóbicas no presentaron una diferencia de pureza significativa. El contenido de endotoxina de las fracciones que contenían OsrHSA obtenidas a partir de cromatografía de interacción hidrofóbica realizada sobre las dos resinas fue inferior a 0,06 UE/mg. Los resultados mostraron que se puede usar la resina de cromatografía hidrofóbica tanto Phenyl Sepharose HP como Phenyl Bestarose HP para la purificación final de OsrHSA y se pueden conseguir una purificación y eliminación de endotoxina mejores.

[Ejemplo 5] Purificación de albúmina sérica humana recombinante

Cromatografía de intercambio catiónico como purificación primaria: se empaquetaron aproximadamente 400 mL de resina Capto MMC en una columna cromatográfica XK50/400 mm y, a continuación, se lavó con NaOH 0,5 N durante 30 min para matar los pirógenos. Se equilibró la columna con 2 L de tampón de equilibrado I (2 g/L de acetato sódico anhidro, 11 g/L de NaCl, se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético) a una velocidad de flujo de 300 cm/h hasta que el pH alcanzó 5,0 y fue estable. Se cargaron 10 L de muestra en la columna y la muestra tuvo una conductividad de 20,3 mS/cm y un pH de 4,8. Tras cargar la muestra, se equilibró la columna cromatográfica con 2 L de tampón de equilibrado II (2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, etanol anhidro al 10-11 % (v/v), se ajustó el pH a 4,8 con ácido acético, se preparó con agua para inyección) a una velocidad de flujo de 300 cm/h. Se eluyeron las impurezas con 3000 mL de tampón de lavado (2 g/L de acetato sódico anhidro, etanol anhidro al 16 % (v/v), se ajustó una conductividad de 83,5 mS/cm con NaCl, se ajustó el pH a 5,0 con ácido acético, se preparó con agua para inyección) a una velocidad de flujo de 300 cm/h. Se eluyó la proteína objetivo con el tampón de elución (2,67 g/L de dihidrogenofosfato sódico, 2,82 g/L de hidrogenofosfato disódico, 23,4 g/L de NaCl, pH 6,3-6,4, preparado con agua para inyectables) para obtener la fracción que contenía OsrHSA. Los electrofotogramas se muestran en la Fig. 8A.

Resina compuesta aniónica/hidrofóbica utilizada para la cromatografía de intercambio como purificación secundaria: se empaquetaron aproximadamente 68 mL de resina Capto-Adhere en una columna cromatográfica XK26/200 mm. Se equilibró la columna con 600 mL de tampón de equilibrado (1,0 g/L de dihidrogenofosfato sódico, 5,0 g/L de hidrogenofosfato disódico, 5,0 g/L de NaCl, pH 7,5-7,6) a una velocidad de flujo de 300 cm/h hasta que el pH alcanzó 7,5-7,6 y fue estable. Se cargaron 500 mL de muestra en la columna a una velocidad de flujo de 300 cm/h. Se reequilibró la columna con aproximadamente 200 mL del tampón de equilibrado y, a continuación, se eluyó con tampón de elución (1,5 g/L de dihidrogenofosfato sódico, 5,0 g/L de hidrogenofosfato disódico, 23,4 g/L de NaCl, pH 7,1-7,2) a una velocidad de flujo de 300 cm/h para recoger la fracción que contenía OsrHSA. El contenido de endotoxina de la fracción recogida fue de 100-200 UE/mL. Los electrofotogramas se muestran en la Fig. 8B.

Cromatografía hidrofóbica como purificación final: se empaquetaron aproximadamente 15 mL de resina Phenyl Sepharose HP en una columna cromatográfica XK16/200 mm. Se equilibró la columna con 100 mL de tampón de equilibrado (2,32 g/L de acetato sódico anhidro, 2,81 g/L de hidrogenofosfato sódico, 2 g/L de caprilato sódico, 66 g/L de sulfato amónico, pH 6,5) a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se añadieron 100 mL de la fracción de elución que contenía OsrHSA obtenida a partir de cromatografía sobre Capto-Adhere con sulfato amónico para ajustar la conductividad a 75 mS/cm y, a continuación, se añadieron 0,15 g de caprilato sódico y ácido clorhídrico para ajustar el pH a 6,5. La muestra se cargó a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se recogió el flujo a través en forma de la fracción que contenía OsrHSA. El contenido de endotoxina fue inferior a 0,08 UR/mg y la pureza de la proteína objetivo fue superior al 99,9999 %. Los electrofotogramas se muestran en la Fig. 8C.

[Ejemplo 6] Purificación de albúmina sérica humana recombinante

Se empaquetaron aproximadamente 400 mL de resina Capto MMC en una columna cromatográfica XK50/400 mm y, a continuación, se lavó con NaOH 0,5 N durante 30 min para matar los pirógenos. Se equilibró la columna cromatográfica con 2000 mL de tampón de equilibrado I (2 g/L de acetato sódico anhidro, 11 g/L de NaCl, se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético) a una velocidad de flujo de 300 cm/h hasta que el pH alcanzó 4,5 y fue estable. Se cargaron en la columna 10 000 mL de muestra con una conductividad de 5,5-8,0 mS/cm y un pH de 4,5. Tras cargar la muestra, se reequilibró la columna cromatográfica con 2000 mL de tampón de equilibrado II (2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, alcohol isopropílico al 10-11 % (v/v), se ajustó el pH a 4,5 con ácido acético, se preparó con agua para inyectables) a una velocidad de flujo de 300 cm/h. Se eluyeron las impurezas con 3000 mL de tampón de lavado (2 g/L de acetato sódico anhidro, alcohol isopropílico al 15-16 % (v/v), se ajustó una conductividad de 82-89 mS/cm con NaCl, se ajustó el pH a 4,8-4,9 con ácido acético, se preparó con agua para inyección) a una velocidad de flujo de 300 cm/h. Se eluyó la proteína objetivo con tampón de elución (2,67 g/L de dihidrogenofosfato sódico, 2,82 g/L de hidrogenofosfato disódico, 23,4 g/L de NaCl, pH 6,3-6,4, preparado con agua para inyección) para obtener la fracción que contenía OsrHSA. Los electrofotogramas se muestran en la Fig. 9A.

Resina compuesta aniónica/hidrofóbica utilizada para la cromatografía como purificación secundaria: se empaquetaron aproximadamente 68 mL de resina Capto-Adhere en una columna cromatográfica XK26/200 mm. Se equilibró la columna con 600 mL de tampón de equilibrado (1,0 g/L de dihidrogenofosfato sódico, 5,0 g/L de hidrogenofosfato disódico, 5,0 g/L de NaCl, pH 7,5-7,6) a una velocidad de flujo de 300 cm/h hasta que el pH alcanzó 7,5-7,6 y fue estable. Se cargaron 500 mL de muestra en la columna a una velocidad de flujo de 300 cm/h. Se reequilibró la columna con aproximadamente 200 mL del tampón de equilibrado y, a continuación, se eluyó con tampón de lavado (1,5 g/L de dihidrogenofosfato sódico, 5,0 g/L de hidrogenofosfato disódico, 23,4 g/L de NaCl, pH 7,1-7,2) a una velocidad de flujo de 300 cm/h para recoger la fracción que contenía OsrHSA. El contenido de endotoxina de la fracción recogida fue de 100-200 UE/mL. Los electrofotogramas se muestran en la Fig. 9B.

Cromatografía hidrofóbica como purificación final: se empaquetaron aproximadamente 15 mL de resina Phenyl Sepharose HP en una columna cromatográfica XK16/200 mm. Se equilibró la columna con 100 mL de tampón de equilibrado (2,32 g/L de acetato sódico anhidro, 2,81 g/L de dihidrogenofosfato sódico, 2 g/L de caprilato sódico, 66 g/L de sulfato amónico, pH 6,5) a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se añadieron 100 mL de la fracción de elución que contenía OsrHSA obtenida a partir de cromatografía sobre Capto-Adhere con sulfato amónico para ajustar la conductividad a 75 mS/cm y, a continuación, se añadieron 0,15 g de caprilato sódico, se ajustó el pH a 6,5 con ácido clorhídrico, se cargó a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Se recogió el flujo a través en forma de la fracción que contenía OsrHSA. El contenido de endotoxina fue inferior a 0,08 UR/mg y la pureza de la proteína objetivo fue superior al 99,9999 %. Los electrofotogramas se muestran en la Fig. 9C.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aislar y purificar albúmina sérica humana recombinante de alta pureza, que comprende secuencialmente las etapas siguientes de:
- 5 a) someter el extracto bruto de albúmina sérica humana recombinante a cromatografía de intercambio catiónico, añadiendo etanol en los tampones para eliminar la endotoxina, para obtener producto primario I; dichos tampones comprenden un tampón de lavado, un tampón de equilibrio I y un tampón de equilibrio II; el tampón de lavado comprende etanol anhidro al 10-20 % en volumen, el tampón de equilibrio I comprende etanol anhidro al 0-10 % en
- 10 volumen, el tampón de equilibrio II comprende etanol anhidro al 5-15 % en volumen; equilibrando la columna cromatográfica con tampón de equilibrado I, cargando la muestra, equilibrando la columna cromatográfica con tampón de equilibrado II, eluyendo la impurezas con tampón de lavado, eluyendo la proteína objetivo con el tampón de elución;
- 15 la cromatografía de intercambio catiónico se realiza sobre una resina compuesta catiónica/hidrofóbica seleccionada de entre Capto-MMC o Bestarose Diamond MMC;
- b) someter el producto primario I a cromatografía de intercambio aniónico para obtener producto secundario II; la cromatografía de intercambio aniónico se realiza sobre una resina compuesta aniónica/hidrofóbica seleccionada de entre Capto-Adhere o Bestarose Diamond MMA;
- 20 c) someter el producto secundario II a cromatografía hidrofóbica para obtener albúmina sérica humana recombinante de alta pureza;
- la cromatografía hidrofóbica se realiza sobre una resina seleccionada de entre Phenyl Sepharose HP, Phenyl Sepharose FF, Phenyl Bestarose HP o Phenyl Bestarose FF.
- 25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el tampón de lavado comprende etanol anhidro al 15 % en volumen, el tampón de equilibrio II comprende etanol anhidro al 10 % en volumen.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el tampón de lavado comprende: 2 g/L de acetato sódico anhidro, etanol anhidro al 15 % en volumen; la conductividad del mismo se ajusta con NaCl a 83 mS/cm, el
- 30 pH del mismo se ajusta a 4,6-5,0 con ácido acético.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el tampón de equilibrio I comprende: 2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl; el pH del mismo se ajusta a 4,2-4,8 con ácido acético.
- 35 5. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el tampón de equilibrio II comprende: 2 g/L de acetato sódico anhidro, 15 g/L de NaCl, etanol anhidro al 10 % en volumen; el pH del mismo se ajusta a 4,2-4,8 con ácido acético.

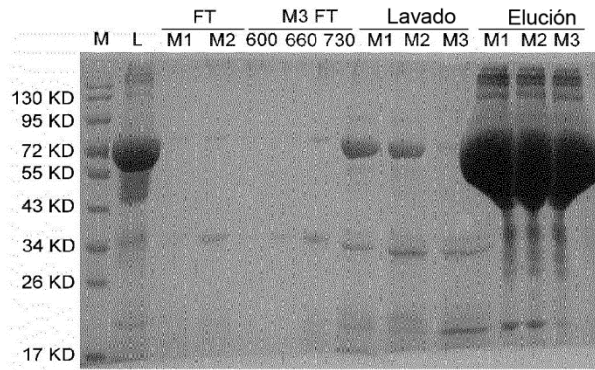


Fig. 1

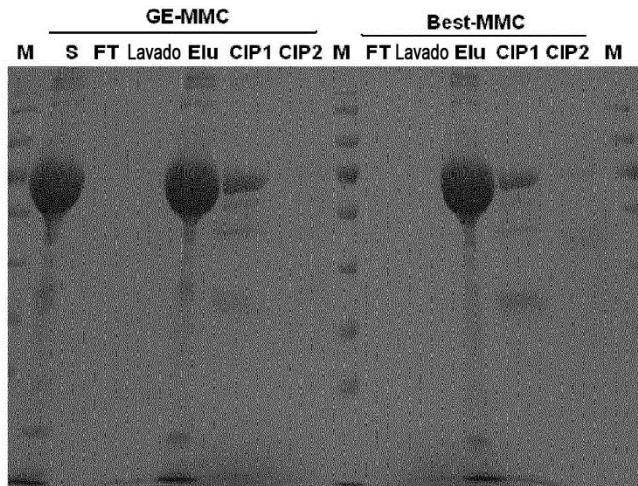


Fig. 2

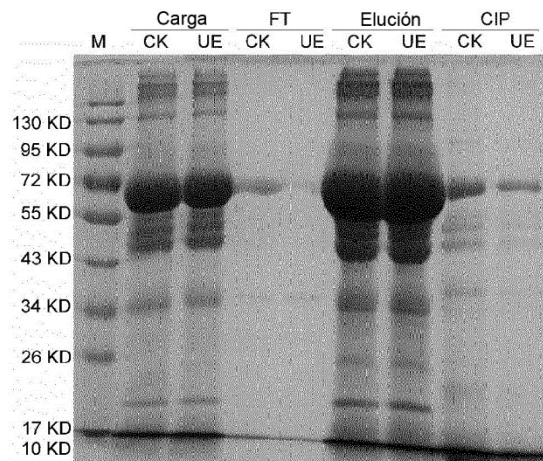


Fig. 3

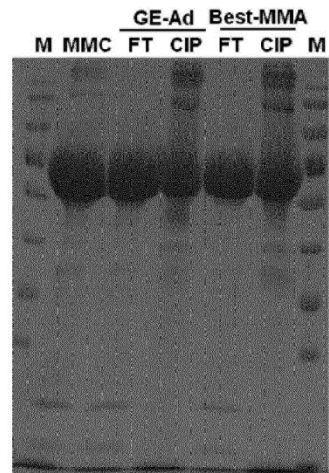


Fig. 4

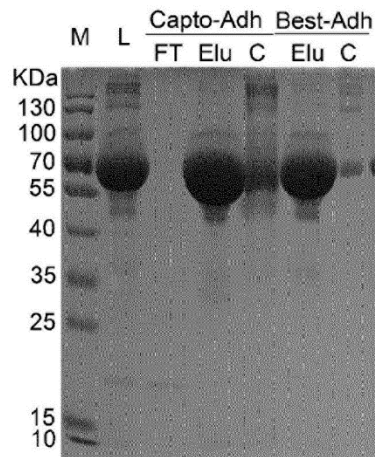


Fig. 5

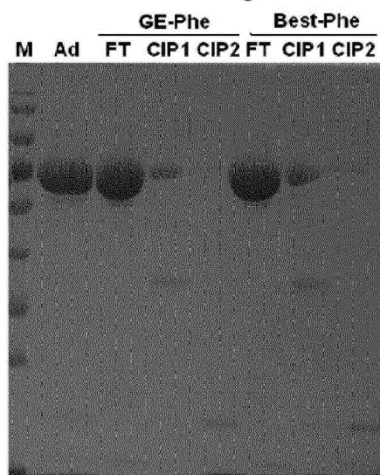


Fig. 6

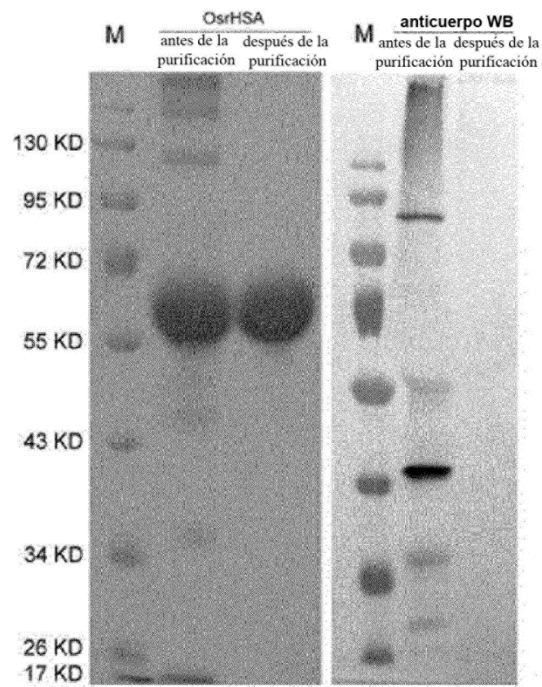


Fig.7

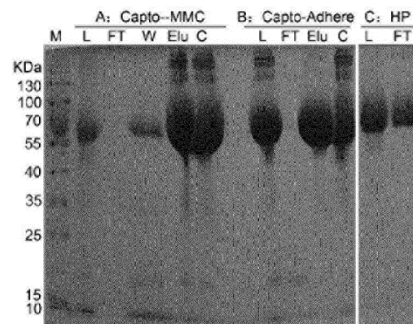


Fig. 8

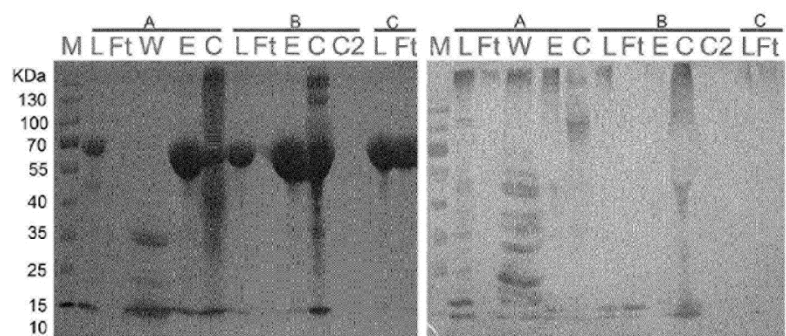


Fig. 9