

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 025**

51 Int. Cl.:

**A23J 1/06** (2006.01)

**C07K 1/22** (2006.01)

**C07K 17/00** (2006.01)

**A61K 35/14** (2015.01)

**A61K 35/16** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.08.2005 PCT/US2005/029739**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.03.2006 WO06023831**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2005 E 05791084 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 1786273**

54 Título: **Esquemas de aislamiento y purificación secuencial de proteínas mediante cromatografía de afinidad**

30 Prioridad:

**20.08.2004 US 602868 P**

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

**22.04.2019**

73 Titular/es:

**PROMETIC BIOSCIENCES LTD. (50.0%)**

**Horizon Park, Barton Road, Comberton**

**Cambridge CB23 7AJ, GB y**

**THE AMERICAN NATIONAL RED CROSS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BURTON, STEVEN JAMES;**

**BAINES, BALDEV;**

**CURLING, JOHN;**

**HAYES, TIMOTHY, KEITH;**

**CHEN, DWUN-HOU;**

**BRYANT, CHRISTOPHER y**

**HAMMOND, DAVID, JOHN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 710 025 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

Esquemas de aislamiento y purificación secuencial de proteínas mediante cromatografía de afinidad

## 5 I. CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a procedimientos de aislamiento de proteínas a partir de muestras biológicas. En particular, la invención se refiere a procedimientos para recuperar proteínas altamente purificadas secuencialmente a partir de muestras biológicas, como se definen en las reivindicaciones.

10

## II. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El procesamiento y desarrollo de proteínas requiere un procesamiento de alta eficiencia con el mínimo número de etapas y el máximo rendimiento para conseguir la pureza necesaria. Los procedimientos de separación y purificación de proteínas presentan unos retos únicos debido a la variedad de proteínas, la diferente naturaleza de los posibles contaminantes y/o impurezas asociados a la preparación de cada proteína, y la gran cantidad de proteínas normalmente necesaria para la producción de productos biofarmacéuticos. Las tecnologías de purificación convencionales generalmente implican una serie de etapas de purificación con el objetivo de aislar una única proteína diana. Con cada etapa, se reduce el rendimiento y aumentan los costes de fabricación. Los costes de separación y purificación de proteínas habitualmente representan más del 50 % de los costes totales de fabricación de todas las proteínas terapéuticas.

La cromatografía de afinidad es una de las técnicas de separación más importantes como base para el descubrimiento de fármacos y el desarrollo de procedimientos. Cuanto más selectivas sean la una o más etapas de afinidad, mayor eficiencia de todo el proceso, lo que representa un requisito crítico en los experimentos de fraccionamiento de proteínas. La cromatografía de afinidad cuenta con cierto número de aplicaciones prácticas en la purificación, detección y extracción de moléculas diana de corrientes multicomponente. La cromatografía de afinidad se basa en interacciones tridimensionales específicas entre las moléculas diana y las entidades a las que se unen (es decir, los ligandos). Se pueden aislar o generar ligandos para que se unan de una forma específica y reversible a prácticamente cualquier molécula diana. Los ligandos potenciales incluyen moléculas biológicas tales como proteínas, anticuerpos y péptidos, y ligandos sintéticos diseñados o seleccionados específicamente. Se pueden generar bibliotecas de millones de ligandos potenciales usando técnicas de síntesis combinatoria, muchas de las cuales se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Lam y col., Nature: 354, 82-84 (1991)). Para ayudar a la separación de moléculas diana de una muestra, los ligandos se pueden fijar a una matriz de soporte sólida, tal como partículas individuales (p. ej., lechos de resinas cromatográficas) o soportes contiguos (p. ej., distribuciones ordenadas). Los ligandos inmovilizados sobre una matriz de soporte sólida pueden, a continuación, emplearse para purificar dianas a partir de soluciones complejas.

Quizá, el mayor logro de la cromatografía de afinidad a escala se ha conseguido en el campo de la purificación de anticuerpos monoclonales biofarmacéuticos. La demanda de resina de proteína A es superior a 10 000 litros anuales y aumenta un 50 % al año, lo que representa un mercado de adsorbente de proteína A de más de 50 millones de dólares estadounidenses en 2002. El uso de la cromatografía de inmutofinidad permite la producción de los factores de coagulación VIII y IX, tanto derivados de plasma como recombinantes, así como de otras proteínas plasmáticas y productos biofarmacéuticos procedentes de fuentes naturales y recombinantes.

Una de las formas de la cromatografía de afinidad moderna más potentes para su uso en el procesamiento aguas abajo, sin embargo, no se basa en ligandos derivados de fuentes naturales tales como anticuerpos, sino en el uso de ligandos de afinidad sintéticos altamente estables. Véase, por ejemplo, Sproule y col., New Strategy for the Design of Ligands for the Purification of pharmaceutical proteins by affinity chromatography; J. Chromatography B, 740, 17-33 (2000). Esta estrategia usa ligandos personalizados o diseñados en lugar de utilizar compuestos comercialmente disponibles.

Entre las proteínas plasmáticas aisladas en la técnica, la albúmina y la gammaglobulina se han destinado particularmente a fines medicinales. Los procedimientos empelados normalmente para aislar estas proteínas plasmáticas se basaban en el procedimiento de precipitación con etanol frío desarrollado por E. J. Cohn y colaboradores durante los años 40. Véase, Cohn y col., Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids; J. Am. Chem. Soc., 68, 459-475 (1946). Este procedimiento fue desarrollado originalmente para producir albúmina con alto rendimiento, pero no fue diseñado para aislar y purificar la variada gama de proteínas actualmente producidas a partir de plasma. En particular, mediante estas técnicas, los rendimientos de los componentes menores de las

proteínas plasmáticas son invariablemente tan bajos que las técnicas son inevitablemente ineficientes en términos de rendimiento del fraccionamiento general. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.138.034 de Uemura y col.

- La aplicación de la cromatografía de afinidad a la purificación de albúmina sérica se conoce en la técnica, véase, 5 Harvey M.J., en: Curling JM (ed) *Methods of Plasma Protein Fractionation*. Academic Press London. págs. 189-200. La primera separación de proteínas a partir de plasma notificada data de aproximadamente hace 30 años y afectaba a la depleción de albúmina sérica humana (ASH) del plasma mediante cromatografía para permitir la identificación y purificación de proteínas de concentración baja. Travis, J., y Pannell, R. *Behring Inst. Mitt.* 54: 30-32 (1974). Este trabajo se llevó a cabo utilizando un conjugado de dextrano Procion Blue-Sepharose® e identificó un problema inicial 10 con la cromatografía de afinidad con colorantes, es decir, la fuga del colorante al eluato. Los autores estaban interesados en el aislamiento de alfa-1-antitripsina a partir de plasma y describieron la difícil separación de esta proteína de la albúmina a alta fuerza iónica, a la que toda unión por intercambio iónico no específica se encuentra en un mínimo.
- 15 También se notificó el aislamiento de diversas otras proteínas a partir de plasma. Por ejemplo, los procedimientos de la técnica anterior describían el aislamiento y purificación de la proteína plasmática factor VIII y fracciones de fibronectina, véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 4.822.872; 4.093.608 y 4.565.651. Los procedimientos de aislamiento y purificación de antitrombina-III se describen en, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 3.842.061. Los procedimientos de aislamiento y purificación de plasminógeno se describen en, por ejemplo, *Science*: 170, 1095 20 (1970), las patentes de EE. UU. n.º 4.361.652 y 4.361.653). Los procedimientos de aislamiento y purificación de inmunoglobulinas se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 4.371.520 y 4.093.606). Los procedimientos de aislamiento y purificación de heptaglobulina se describen en, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 4.061.735 y 4.137.307). Estos procedimientos, sin embargo, carecen de la especificidad y selectividad necesarias para el aislamiento de proteínas usadas en la producción de múltiples agentes biofarmacéuticos a partir del mismo 25 material de partida, p. ej., plasma humano.

El documento WO0/48703 A1 describe un procedimiento de purificación consecutiva de una o más proteínas diana (IgG) a partir de plasma humano no procesado. El documento no menciona unión secuencial de plasminógeno antes de IgG y de IgG antes de albúmina a los ligandos.

- 30 Aunque los procedimientos para aislar proteínas a partir de muestras biológicas han proporcionado alguna mejora en la calidad del producto, en términos de actividad específica y pureza mejoradas, y también en el rendimiento o la recuperación, todavía hay una necesidad de mejora adicional de los procedimientos para obtener un concentrado proteico, con alto rendimiento y alta pureza, con minimización de la reducción de la actividad específica de las 35 proteínas aisladas asociada frecuentemente a los procedimientos de la técnica anterior. Esto es particularmente cierto en situaciones en las que se aíslan simultáneamente múltiples dianas proteicas a partir de una fuente común. Esta invención resuelve estas y otras necesidades existentes desde hace tiempo proporcionando procedimientos que utilizan técnicas de cromatografía de afinidad para aislar y purificar diversas proteínas eficientemente a partir de materiales biológicos, y particularmente a partir de plasma, combinando procedimientos de adsorción en secuencias 40 predeterminadas y definidas.

### III. RESUMEN DE LA INVENCION

- La invención, como se describe y describe en este documento, proporciona procedimientos de aislamiento y 45 purificación secuencial de proteínas a partir de muestras de plasma. Los procedimientos comprenden (i) proporcionar una muestra de plasma, (ii) proporcionar ligandos que se unan, cada uno de ellos, selectiva y específicamente a una proteína diana de la muestra biológica, donde cada uno de los ligandos está opcionalmente fijado a un soporte para formar complejos ligando-soporte, (iii) poner en contacto los ligandos o complejos ligando-soporte, secuencialmente y en un orden predeterminado, con la muestra de plasma para permitir que cada ligando o complejo ligando-soporte una 50 secuencialmente la proteína diana de la muestra de plasma, donde el orden predeterminado de poner en contacto los ligandos o complejos ligando-soporte con la muestra de plasma deriva en la unión de plasminógeno antes de IgG y de IgG antes de albúmina, y donde, antes de dicha puesta en contacto, la muestra biológica no se procesa mediante una etapa de preacondicionamiento seleccionada del grupo que consiste en precipitación con alcohol, crioprecipitación, eliminación de lípidos y/o proteínas lipídicas, precipitación de euglobulina, o una combinación de las mismas, (iv) eluir la proteína diana unida a cada uno de los ligandos o complejos ligando-soporte, y (v) aislar la proteína 55 diana secuencialmente de la muestra biológica. La etapa de preacondicionamiento comprende diversos procedimientos tales como, por ejemplo, precipitación con alcohol, crioprecipitación, eliminación de lípidos y/o proteínas lipídicas, precipitación de euglobulina, o una combinación de los mismos, entre otros.

En una realización, la proteína diana comprende fibrinógeno (Fg), inhibidor de la proteinasa alfa-1 (A1PI), apolipoproteína A1 (ApoA1), inmunoglobulinas (IgG), paraoxonasa (PON), factores de coagulación, factor de Von Willebrand (vWF), Factor VIII (FVIII), albúmina sérica humana (ASH), plasminógeno (Pg), o cualquier combinación de los mismos.

5

En otra realización más, la actividad de paraoxonasa se mantiene sustancialmente en la muestra biológica durante el aislamiento de proteína.

En una realización, se aísla vWF/FVIII del plasma antes de plasminógeno.

10

En otra realización, se aísla apolipoproteína A1 del plasma antes de IgG.

En otra realización, se aísla plasminógeno del plasma antes de fibrinógeno.

15 El orden predeterminado de poner en contacto los dos o más ligandos con la muestra biológica puede derivar en la unión secuencial de vWF/FVIII, Pg, Fg, ApoA1/PON, IgG, ASH y A1PI en el orden indicado.

El orden predeterminado de poner en contacto los dos o más ligandos con la muestra biológica puede derivar en la unión secuencial de vWF/FVIII, ApoA1/ PON, Pg, Fg, IgG, ASH y A1PI en el orden indicado.

20

El orden predeterminado de poner en contacto los dos o más ligandos con la muestra biológica puede derivar en la unión secuencial de vWF/FVIII, IgG, ASH y A1PI en el orden indicado.

25 Los ligandos de la invención comprenden moléculas a base de polipéptidos o ácidos nucleicos, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, moléculas no a base de polipéptidos o nucleótidos, miméticos de carbohidratos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas, materiales inorgánicos, colorantes, carbohidratos, lípidos, o cualquier combinación de los mismos.

En una realización, los ligandos son péptidos que comprenden de 1 a 15 aminoácidos.

30

En otra realización, los ligandos y/o complejos ligando-soporte comprenden ligandos de afinidad sintéticos tales como ligandos Mimetic Blue®, ligandos MAbsorbent®, ProMetic PBL 112-80, ProMetic PBL 112-81, ProMetic PBL 112-82 y ProMetic PBL 112-83.

35 El soporte comprende un material sintético, un material natural, o ambos. Los ejemplos de soportes incluyen agarosa, poli(acrilamida), dextrano, celulosa, polisacárido, nitrocelulosa, sílice, alúmina, óxido de aluminio, dióxido de titanio, óxido de titanio, circonita, estireno, difluoruro de polivinilo, nailon, copolímero de estireno y divinilbenceno, éster de polimetacrilato, metacrilato de hidroxietilo, acrílico, alcohol polivinílico, polietilenglicol, polímero o copolímero de azlactona derivatizada, vidrio, celulosa, agarosa, derivados de cualquiera de los anteriores, y combinaciones de  
40 cualquiera de los anteriores.

En una realización preferida, el soporte es un lecho de polisacárido o resina.

El plasma se puede purificar sustancialmente con una pureza de al menos un 70 %.

45

La preparación se puede purificar sustancialmente, libre de impurezas causadas por el inmunoabsorbente, y someter a al menos una etapa de inactivación de patógenos.

50 En otra realización más, la muestra de plasma se trata mediante un agente tamponador antes de la etapa de puesta en contacto con el fin de conservar adicionalmente la concentración y actividad de uno o más agentes diana en la muestra de plasma.

La preparación puede formularse en forma de una composición farmacéutica.

55 Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención se describen en detalle en este documento.

#### IV. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

60 En este documento se describen procedimientos para el aislamiento y la purificación eficientes de proteínas a partir de muestras de plasma. En particular, la presente invención describe procedimientos de purificación secuencial de

proteínas a partir de plasma usando cromatografía de afinidad. Los procedimientos de purificación secuencial de proteínas de la presente invención usan dos o más ligandos, cada ligando está opcionalmente fijado a un soporte para formar un complejo ligando-soporte. Cada ligando o complejo ligando-soporte se une selectiva y específicamente a una proteína plasmática diana en un orden predeterminado para permitir que cada ligando o complejo ligando-soporte una secuencialmente una proteína diana del plasma.

Los procedimientos de aislamiento y purificación secuencial de proteínas de la invención son altamente específicos y no requieren preacondicionamiento específico del plasma, como se usaba rutinariamente en la técnica anterior, antes de la puesta en contacto con el ligando. Tal etapa de preacondicionamiento no incluye tamponamiento o filtración general. La etapa de preacondicionamiento dentro del alcance de la invención incluye, por ejemplo, procedimientos y procesamientos tales como precipitación con alcohol, crioprecipitación, eliminación de lípidos y/o proteínas lipídicas, precipitación de euglobulina, o una combinación de los mismos, entre otros. En este documento, se entiende que las etapas de preacondicionamiento antes mencionadas quedan específicamente excluidas de la invención reivindicada. Los procedimientos de purificación de proteínas plasmáticas de la presente invención son muy valiosos en la producción de productos biofarmacéuticos gracias a su capacidad para producir proteínas plasmáticas sustancialmente puras y altamente activas de forma eficiente y rápida. Los procedimientos de la presente invención también son útiles en una variedad de otras aplicaciones, que incluyen el pronóstico, el diagnóstico y/o la detección de anomalías.

## 20 1. Definiciones

Como se usa en este documento, «muestra» incluye cualquier muestra de plasma que contenga una proteína diana que se pueda aislar y purificar mediante el procedimiento de la invención.

25 Como se usa en este documento, «cultivo celular» incluye cualquier cultivo procarionta o eucariota tal como, por ejemplo, cultivo bacteriano, de levaduras y de otras células microbiológicas, cultivo de células de mamífero, cultivo de células vegetales y cultivo de insectos, caldos de fermentación y otros cultivos celulares usados para la producción y el suministro de productos biofarmacéuticos y la preparación de productos terapéuticos.

30 Como se usa en este documento, «plasma» se refiere a componentes de la sangre líquidos e incluye derivados del plasma y composiciones que contienen plasma.

Como se usa en este documento, «fijación» se define en general dentro del alcance de la invención e incluye cualquier tipo de procedimiento de unión físico, químico o biológico entre dos entidades e incluye, por ejemplo y no de forma limitante, absorción, adsorción, enlace covalente, intercambio iónico, hidrofóbico, enlace de hidrógeno, interacción entre dipolos, cuadrupolos o por afinidad, formación de especies cargadas, la fijación de ligandos de afinidad (p. ej., incluyendo péptidos, oligonucleótidos, proteínas, brazos espaciadores, restos hidrofóbicos y materiales fluorados), entre otros.

40 Como se usa en este documento, «ligandos» se define en general dentro del alcance de la invención e incluye entidades químicas o biológicas que se unen a una proteína diana. Los ligandos son compuestos, moléculas, células y componentes celulares que se unen a una proteína diana y pueden aislarse a partir de materiales naturales o producidos sintéticamente. Los ligandos pueden ser endógenos o exógenos a un procarionta o eucariota. Los ligandos incluyen péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas, colorantes, compuestos que contienen triazina, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, moléculas a base de ácidos nucleicos, moléculas no a base de polipéptidos o nucleótidos, carbohidratos, miméticos de carbohidratos, lípidos, materiales inorgánicos, inhibidores, sustratos o cualquier combinación de los mismos.

50 Como se usa en este documento, «sustancialmente purificada» o «sustancialmente libre» se refiere a proteínas que se han retirado de su entorno natural y se han aislado o separado, y están al menos aproximadamente un 70 % libres, preferentemente aproximadamente un 85 % libres, más preferentemente aproximadamente un 95 %, y lo más preferentemente aproximadamente un 99 % o más libres de otros componentes con los que están asociadas de forma natural.

55 Como se usa en este documento, «moléculas a base de polipéptidos» incluye todas las proteínas, polipéptidos o fragmentos peptídicos, péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de los polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, agonistas, antagonistas y anticuerpos, entre otros.

60

Como se usa en este documento, «moléculas pequeñas» incluye carbohidratos, miméticos de carbohidratos, peptidomiméticos, compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, incluyendo compuestos heteroorgánicos y organometálicos) que tengan un peso molecular inferior a aproximadamente 10 000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tengan un peso molecular inferior a aproximadamente 5 000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tengan un peso molecular inferior a 1 000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tengan un peso molecular inferior a 500 gramos por mol, y sales, ésteres y otras formas químicamente aceptables de tales compuestos.

Como se usa en este documento, por el término «patógeno» se entiende cualquier agente replicable que pueda encontrarse en una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, o infectar un organismo. Tales patógenos incluyen los diversos virus, bacterias, protozoos y parásitos conocidos por los expertos en la materia que se encuentran generalmente en, o infectan, la sangre total o componentes de la sangre y otros contaminantes patógenos aún no conocidos. Los ejemplos ilustrativos de tales patógenos incluyen bacterias, tales como especies de *Streptococcus*, especies de *Escherichia* y especies de *Bacillus*; virus, tales como virus de la inmunodeficiencia humana y otros retrovirus, virus del herpes, paramixovirus, citomegalovirus, virus de la hepatitis (incluyendo hepatitis A, hepatitis B y hepatitis C), poxvirus y togavirus; y parásitos, tales como parásitos maláricos, incluyendo especies *Plasmodium*, y parásitos tripanosómicos.

Generalmente, un experto en la técnica aplicable entenderá otros términos usados en el campo de la purificación de proteínas como se usan en este documento.

En una realización, la invención proporciona procedimientos de extracción de proteínas plasmáticas específicas del plasma. Estos procedimientos utilizan resinas cromatográficas a las que se fijan ligandos selectivos y específicos para dos o más proteínas plasmáticas. Las resinas se ponen en contacto con plasma, contacto que deriva en la unión selectiva de la proteína diana con el ligando. La proteína diana puede, a continuación, eluirse con una alta recuperación y pureza. Por tanto, de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, el plasma se puede fraccionar eficientemente en diversas proteínas plasmáticas que lo componen. Las secuencias preferidas para la extracción y posterior aislamiento de proteínas plasmáticas específicas se describen en este documento.

Las proteínas plasmáticas dentro del alcance de la invención incluyen todas y cada una de las más de 10 000 proteínas diferentes presentes en el plasma, incluyendo, por ejemplo y no de forma limitante, butirilcolinesterasa (BChE), factores de la coagulación sanguínea (p. ej., fibrinógeno, factor II, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI y factor XII), fibronectina, protrombina, proteína C, plasminógeno, antitrombina-III, haptoglobina, transferrina, albúmina, inhibidor de la proteínasa alfa-1, apolipoproteína A1 (también conocida como lipoproteína Apo-A1), inmunoglobulinas, paraoxonasa, factor de Von Willebrand (vWF), todas las cuales se encuentran de forma natural en el plasma de un organismo en estado sano.

Como alternativa, la proteína plasmática dentro del alcance de la invención está presente en plasma asociado a un estado enfermo, la cual puede o no encontrarse en el plasma de un sujeto sano. También quedan abarcadas dentro del alcance de la invención las proteínas plasmáticas que están presentes en el plasma como consecuencia de la administración de un agente, p. ej., un fármaco. A este respecto, la proteína plasmática puede ser una proteína priónica PrPsc.

### 1. Ligandos

El procedimiento de purificación de proteínas de la invención utiliza dos o más ligandos que están fijados a un sistema de soporte. Los ligandos pueden comprender uno o más grupos funcionales para proporcionar interacciones iónicas, hidrofóbicas, por enlaces de hidrógeno o de Van der Waal's con los correspondientes grupos de la biomolécula que se va a separar. Los ligandos adecuados para el procedimiento inventivo incluyen compuestos químicos sintéticos que se producen, por ejemplo, por medio de síntesis directa, o bibliotecas de diversidad, tales como bibliotecas peptídicas o no peptídicas aleatorias o combinatorias. Otras bibliotecas conocidas en la técnica incluyen bibliotecas sintetizadas químicamente, bibliotecas recombinantes (p. ej., bibliotecas de expresión en fago) y bibliotecas basadas en traducción *in vitro*. Las bibliotecas se pueden cribar para encontrar moléculas que se unan específicamente a una proteína diana de la invención.

Ejemplos de bibliotecas sintetizadas químicamente se describen, por ejemplo, en Fodor y col., Science 251:767-773 (1991); Houghten y col., Nature 354:84-86 (1991); Brenner y Lemer, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 89:5381-5383 (1992) y la patente de EE. UU. n.º 6.117.996, entre otros. Ejemplos de bibliotecas de expresión en fago se describen, por ejemplo, en Scott y Smith, Science 249:386-390 (1990); Devlin y col., Science 249:404-406 (1990) y Christian y

col., J. Mol. Biol. 227:711-718 (1992), entre otros. Bibliotecas basadas en traducción *in vitro* se describen, por ejemplo, en Mattheakis y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 91:9022-9026 (1994), entre otros.

En una realización, el ligando de la invención es un péptido que consiste esencialmente en de 3 a 5, 8, 10 o 15 aminoácidos. Los aminoácidos son D y/o L-aminoácidos. El péptido se puede seleccionar convenientemente de cualquier biblioteca peptídica, incluyendo bibliotecas peptídicas aleatorias, bibliotecas peptídicas combinatorias, o bibliotecas peptídicas sesgadas. El término «sesgada» se usa en este documento para indicar que el procedimiento de generar la biblioteca se manipula con el fin de restringir uno o más parámetros que gobiernan la diversidad de la colección de moléculas resultante.

En las bibliotecas peptídicas, el número de péptidos discretos de secuencias diferentes aumenta drásticamente con el número de reacciones de acoplamiento realizadas, el tamaño del péptido y el número de aminoácidos distintos utilizados. Por ejemplo, la incorporación aleatoria de 19 aminoácidos en pentapéptidos produce hasta 2 476 099 (19<sup>5</sup>) péptidos individuales de secuencia diferente (Lam y col., arriba). Los procedimientos combinatorios permiten la generación de bibliotecas de ligandos directamente sobre un soporte. Habitualmente, los ligandos se sintetizan sobre partículas de soporte de tal forma que se sintetizan múltiples copias de un único ligando sobre cada partícula (p. ej., lecho), aunque esto no es necesario en el contexto de la invención.

Otro ejemplo de una biblioteca que puede usarse, en la que las funcionalidades amida de los péptidos se han permitido para generar una biblioteca combinatoria transformada químicamente, es descrito por Ostresh y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 91:11138-11142 (1994).

Las bibliotecas no peptídicas pueden clasificarse en general en dos tipos: monómeros y oligómeros decorados. Las bibliotecas de monómeros decorados emplean una estructura de almacén relativamente sencilla sobre la que se añade una variedad de grupos funcionales. Con frecuencia, el almacén será una molécula con una actividad farmacológica útil conocida. Por ejemplo, el almacén podría ser la estructura de la benzodiazepina.

Las bibliotecas de oligómeros no peptídicas utilizan un gran número de monómeros que se juntan de modos que crean nuevas formas que dependen del orden de los monómeros. Entre las unidades de monómero que se han usado están los carbamatos, las pirrolinonas y los morfolinós. Los peptoides, y oligómeros similares a péptidos en los que la cadena lateral está fijada al grupo amino alfa en lugar de al carbono alfa, constituyen la base de otra versión de bibliotecas de oligómeros no peptídicas. Las primeras bibliotecas de oligómeros no peptídicas utilizaban un único tipo de monómero y, por tanto, contenían una cadena principal repetitiva. Las bibliotecas recientes han utilizado más de un monómero, aportando a las bibliotecas una flexibilidad añadida.

Otras bibliotecas no peptídicas que son útiles en la presente invención son, por ejemplo, las bibliotecas descritas por Ecker y Crooke, Bio/Technology 13:351-360 (1995). Estas bibliotecas que usan compuestos tales como, por ejemplo, benzodiazepinas (véase, p. ej. Bunin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 91:4708-4712 (1994)) se pueden adaptar para su uso. Adicionalmente, también se pueden usar bibliotecas de peptoides (p. ej., Simon y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 89:9367-9371 (1992)). Otros compuestos usados en bibliotecas peptídicas incluyen hidantoínas, piperazinadionas, bifenilos, análogos de azúcares, beta-mercaptocetonas, ácidos arilacéticos, acilpiperidinas, benzopiranos, cubanos, xantinas, aminimidias y oxazolonas, entre otros.

El cribado de las bibliotecas se puede conseguir mediante cualquiera de una variedad de procedimientos comúnmente conocidos. Véase, p. ej., la bibliografía siguiente, que describe el cribado de bibliotecas peptídicas: Parmley y Smith, Adv. Exp. Med. Biol. 251:215-218 (1989); Scott y Smith, id.; Fowlkes y col., BioTechniques 13:422-427 (1992); Oldenburg y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 89:5393-5397 (1992) y Yu y col., Cell 76:933-945 (1994), entre otros. El cribado para identificar una molécula que une una proteína diana también se puede llevar a cabo poniendo en contacto los miembros de la biblioteca con la proteína diana inmovilizada sobre una fase sólida y recolectando los miembros de la biblioteca que se unen a la proteína de interés. Ejemplos de tales procedimientos de cribado, denominados técnicas de selección por afinidad o «panning», se describen a modo de ejemplo en Fowlkes y col. id.

Preferentemente, los ligandos de la invención se diseñan mediante modelado y química combinatoria e incluyen ligandos sintéticos/biomiméticos que pueden ser moléculas simétricas o asimétricas, sencillas o ramificadas. Los ligandos preferentemente son resistentes a los álcalis y resisten los procedimientos de regeneración alcalina y desinfección normales. Los ligandos de la invención tienen pérdidas muy bajas, son seguros y poseen una alta capacidad de unión y especificidad a la proteína diana.

Los ligandos o sistemas de soporte y ligandos preferidos usados dentro del alcance de la invención incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, ligandos Mimetic Blue® (para columnas de ASH), y la resina se denomina

Mimetic Blue® SAHL P6XL; ligandos MAbsorbent® (para la unión de IgG), y el adsorbente se denomina MAbsorbent® A2P; adsorbente ProMetic PBL 112-80 para A1PI; adsorbente ProMetic PBL 112-81 para fibrinógeno; adsorbente ProMetic PBL 112-82 para plasminógeno; adsorbente ProMetic PBL 112-83 para vWF/Factor VIII; ECH-Lys-Sepharose FF, n.º de lote 243526; resina SAHL P6XL; y resinas de ligandos peptídicos que incluyen ARQFDF (SEQ ID NO: 1). Los adsorbentes antes mencionados usan Purabead 6XL (agarosa reticulada) como matriz de soporte. Las matrices de soporte Purabead 6 o 6XL no adsorben estas proteínas por sí mismas.

## 2. Soporte

10 En una realización del procedimiento inventivo, el lijando está fijado a un soporte. El término «soporte», como se usa en este documento, se refiere a cualquier matriz de soporte, tal como los soportes sólidos conocidos en la técnica, que sirva para inmovilizar el ligando. Un soporte o matriz de soporte es cualquier sustancia sólida o líquida, porosa o no porosa, bidimensional o tridimensional, a la que se puede fijar un ligando y que proporciona un medio conveniente de separación del ligando de los solutos en una solución de puesta en contacto. Preferentemente, el soporte es inerte  
15 después de la fijación del ligando de tal forma que se minimiza la reacción covalente con la diana.

También se incluye dentro del alcance de la invención el uso de brazos espaciadores para el acoplamiento de los ligandos al soporte. Los brazos espaciadores pueden tomar una amplia variedad de formas diferentes, incluyendo materiales hidroxilados como polietilenglicoles, óxidos de polietileno, alcanos lineales o ramificados, diaminas, glicoles,  
20 anillos aromáticos y carbohidratos o cualquier combinación de los mismos, entre otros.

En una realización, la matriz de soporte comprende partículas porosas que tienen capacidad de adsorción o absorción del agente diana. Las partículas están opcionalmente revestidas con uno o más materiales para modificar las propiedades superficiales de la matriz de soporte, dichos materiales tienen o no capacidad de hinchamiento en fluidos  
25 orgánicos o fluidos acuosos y son sustancialmente insolubles en agua o fluidos.

Una matriz de soporte preferida usada con el esquema de purificación secuencial de proteínas de la presente invención es una partícula porosa. Se comercializan partículas porosas de una gran variedad de materiales diferentes para separaciones por adsorción, incluyendo sílice, vidrio, celulosa, agarosa y una amplia variedad de polímeros diferentes,  
30 incluyendo poliestireno, polimetilmetacrilato, poliacrilamida, agarosa, hidrogel, resinas acrílicas y otros tipos de geles usados para electroforesis. Muchas de las partículas de adsorción porosas, tales como sílice, vidrio y polímeros, se pueden secar y tienen poros interconectados con áreas superficiales en el intervalo de aproximadamente 1-2 m<sup>2</sup>/g de partículas secas a más de 300 m<sup>2</sup>/g de partículas secas. Otros tipos de partículas son los hidrogeles reticulados.

35 Las matrices de soporte particularmente preferidas son agarosa y resina de metacrilato polihidroxilada. Se comercializan diversos geles de perlas de agarosa y resinas poliméricas. Estos soportes se pueden adquirir con ligandos prefijados o, como alternativa, los ligandos se pueden fijar indirectamente o inmovilizar directamente sobre el soporte usando procedimientos estándar (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988); Biancali y col., *Letters in Peptide Science*, 7(291), 297(2000); MacBeath  
40 y col., *Science*, 289, 1760-1763 (2000); Cass y col., ed., *Proceedings of the Thirteenth American Peptide Symposium*. Leiden, Escom, 975-979 (1994); la patente de EE. UU. n.º 5.576.220; Cook y col., *Tetrahedron Letters*; 35, 6777-6780 (1994) y Fodor y col., arriba. En una realización, el uno o más ligandos se sintetizan sobre la superficie del soporte, lo que resulta ventajoso en la generación de bibliotecas peptídicas. El uno o más ligandos se pueden conjugar químicamente al soporte o se pueden fijar a través de conectores, tales como estreptavidina, beta-alanina, glicina,  
45 polímeros que contienen glicina-serina, hidrocarburos de cadena corta de la fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, polietilenglicol, ácido épsilon-aminocaproico, y conectores que comprenden -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, donde n es 1-30.

## 3. Unión y elución de proteínas diana

50 La unión de la proteína diana o biomolécula diana al ligando o complejo ligando-soporte normalmente se realiza poniendo en contacto el ligando o complejo ligando-soporte con una solución acuosa que contiene las dianas. Esto se puede conseguir de una variedad de formas, que incluyen el paso de la solución que contiene la diana a través de un lecho o una columna empaquetados del complejo ligando-soporte, o la adsorción por lotes en un tanque o una suspensión agitados. Preferentemente, la proteína diana se captura mediante el paso de la solución acuosa a través  
55 de una columna cromatográfica usando una bomba para controlar el caudal. La unión ideal de la proteína diana debería realizarse de tal forma que no sea necesario un ajuste previo de la solución y la solución que contiene la diana se aplique directamente al complejo ligando-soporte. Sin embargo, cuando es necesario para la unión, se pueden ajustar las propiedades de la solución que contiene la diana mediante, por ejemplo, dilución, cambios de pH, fuerza iónica o polaridad, cambios de temperatura, y la adición de agentes solubles, que incluyen sales, sales inorgánicas, sales

orgánicas, compuestos quelantes, tioles, detergentes, tensioactivos, disolventes orgánicos, alcoholes, glicoles, agentes caotrópicos, iones metálicos o cualquier combinación de los mismos.

Para recuperar la proteína diana del ligando o el complejo ligando-soporte, el ligando o complejo ligando-soporte se pueden poner en contacto con una solución (p. ej., una «solución de transferencia» o «tampón de elución») que favorezca la disociación de la proteína diana del ligando o el complejo ligando-soporte. La solución de transferencia se puede seleccionar de entre tampones de diversas concentraciones salinas, pH o capacidad de desnaturalización, disolventes orgánicos, agentes modificadores de la polaridad tales como alcoholes y agua desionizada. Como alternativa, o además, un gradiente eléctrico o un cambio de temperatura pueden disociar la proteína diana del complejo proteína-ligando-soporte. Las soluciones de transferencia también pueden comprender ligandos (diferentes del ligando del complejo proteína-ligando-soporte), cofactores para la proteína diana y moléculas enantioméricas específicas. El uso de diferentes soluciones de transferencia permite la investigación de las condiciones de elución o transferencia de una proteína diana específica. Las condiciones de disociación y transferencia empleadas en el procedimiento inventivo se seleccionan para minimizar la alteración del ligando y la proteína diana. En otras palabras, las condiciones de elución y transferencia no deberían liberar el ligando del soporte ni desnaturalizar la proteína diana, a menos que se desee.

En una realización, la proteína diana se detecta e identifica sobre el soporte de proteína-ligando antes de la elución. La detección e identificación de la proteína diana sobre el soporte de proteína-ligando puede comprender la realización de un ensayo de unión. Un ensayo de unión habitualmente implica la puesta en contacto del soporte de proteína-ligando con un resto que se sabe que se une a un sustrato. Los restos de unión para uso en ensayos de unión incluyen, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, proteínas, u oligonucleótidos. Preferentemente, el soporte de proteína-ligando se pone en contacto con un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que une la proteína diana (o un subproducto químico o biológico de la proteína diana o un fragmento del mismo). El resto de unión preferentemente está marcado con un marcador detectable tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un cromóforo o un marcador fluorescente. En tal ensayo de unión, se detecta una señal emitida por el marcador detectable, señalando de ese modo la presencia de la proteína diana. Una vez que se ha dilucidado la presencia de la proteína diana sobre el soporte de proteína-ligando, se puede aislar la proteína.

Los ensayos de unión para la detección de una diana se describen adicionalmente en, por ejemplo, Harlow y Lane, arriba; Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (9ª ed.), Molecular Probes, Eugene, OR (2002). Opcionalmente, el procedimiento inventivo puede comprender además una etapa de lavado para retirar el exceso de restos de unión o marcadores no unidos antes de la detección.

Como alternativa, el procedimiento inventivo puede comprender la realización de un ensayo de actividad enzimática para caracterizar una proteína diana en base a su actividad biológica. Se aplica un sustrato enzimático al soporte de proteína-ligando que permite la modificación enzimática del sustrato por parte de la proteína diana para formar un producto. A continuación, se detecta el producto, identificando de ese modo la presencia de la proteína diana en la muestra.

La unión y elución de proteínas diana se puede medir mediante cualquier procedimiento adecuado, muchos de los cuales existen y cuya ejecución e idoneidad para un fin particular serán conocidas por un experto en la materia.

#### 45 **4. Procedimientos de uso**

La presente invención, como se describe en este documento, proporciona procedimientos de aislamiento secuencial de proteínas a partir de muestras biológicas, dichos procedimientos producen proteínas altamente activas y sustancialmente purificadas. Los procedimientos de la invención son altamente sensibles y capaces de separar cantidades mínimas de proteínas diana de una muestra. Los procedimientos de purificación secuencial de proteínas de la invención son útiles en una variedad de aplicaciones, que incluyen el pronóstico, diagnóstico, detección, purificación, separación, procesamiento de productos génicos expresados *in vitro* y producción de productos biofarmacéuticos. Las técnicas de purificación y extracción de la invención ofrecen ventajas sobre las técnicas de purificación convencionales reduciendo el número de etapas de purificación, mejorando los rendimientos, aumentando la pureza y venciendo las limitaciones asociadas a los procedimientos tradicionales.

En particular, los procedimientos de la presente invención optimizan el procedimiento de purificación de proteínas y mejoran el procedimiento de fabricación de productos biofarmacéuticos aumentando la eficiencia y pureza. Los productos biofarmacéuticos son fármacos que comprenden proteínas, péptidos u otros polinucleótidos complejos o macromoléculas a base de proteínas (en conjunto «productos génicos»). Su procedimiento de fabricación implica la

recuperación del producto génico deseado a partir de su biomasa huésped, tal como plasma o fuentes biológicas no humanas (p. ej., cultivos celulares recombinantes o no recombinantes, leche de animales transgénicos u otras fuentes recombinantes o no recombinantes). La recuperación de rendimientos comercialmente viables de una proteína deseada a partir de una biomasa es un reto, ya que esta contiene proteínas huésped, moléculas de ácido nucleico y otras entidades químicas presentes de forma natural no deseadas.

Los procedimientos de la presente invención se usan para el aislamiento de proteínas a partir de plasma.

En una realización preferida, los procedimientos de la presente invención aíslan secuencialmente proteínas plasmáticas altamente activas de una muestra de plasma. Se pueden separar múltiples proteínas simultánea y rápidamente mediante los procedimientos de la presente invención a partir de cualquier corriente de la industria del procesamiento de plasma destinada a la producción de productos terapéuticos y/o farmacéuticos. Un ejemplo del orden de aislamiento de proteínas plasmáticas se describe en la Tabla 1 que se presenta a continuación.

15 **Tabla 1: Esquema de purificación de proteínas plasmáticas**

Cascada completa	Cascada 1	Cascada abreviada	Cascada inversa
vWF/FVIII	vWF/FVIII		vWF/FVIII
PON			
Pg	Pg		
Fg	Fg		
IgG	IgG	IgG	ASH
ASH	UF/DF	ASH	IgG
UF/DF	ASH	UF/DF	UF/DF
A1PI	UF/DF	A1PI	A1PI
	A1PI		

La proteína plasmática aislada está «sustancialmente purificada», teniendo una pureza de aproximadamente un 70 %, preferentemente aproximadamente un 85 %, más preferentemente aproximadamente un 95 % y lo más preferentemente aproximadamente un 99 % o más. En este documento se entiende que, mediante la enumeración de tales valores de purificación específicos, los valores indicados también incluyen todas las cantidades de números enteros específicas comprendidas entre los valores indicados. Por ejemplo, aproximadamente un 85 % se entiende que también abarca un 80 %, 81 %, 82 %, 83 % y 84 %, sin necesidad de enumerar realmente cada grado específico de purificación sustancial en el mismo.

Habiendo descrito la presente invención en detalle, la misma se entenderá más claramente por referencia a los ejemplos siguientes, que se incluyen en este documento con fines meramente ilustrativos.

**EJEMPLOS**

**Ejemplo 1: Definición de los escenarios de secuencia de cascada lineal 1-7**

La cascada lineal estuvo compuesta por cinco columnas de cromatografía de afinidad: Albúmina (ASH), Fibrinógeno (Fg), IgG, Plasminógeno (Pg) y PON1/ApoA1. Inicialmente, estas columnas se sometieron sucesivamente a ciclos en cuatro secuencias diferentes para determinar la secuencia óptima para la cascada lineal. Con el fin de simplificar el análisis de muestras durante el procedimiento, solo se recogió el volumen de elución no diluido como carga para la columna siguiente de la secuencia. Específicamente, esto ayudó a mantener la concentración de proteínas originales constante a lo largo de todo el experimento. También simplificó la comparación de salida frente a entrada en cada columna. Se ensayaron muestras de la carga y de cada volumen de elución para monitorizar la recuperación de las proteínas diana y no diana en el volumen de elución. Estos valores se usaron para monitorizar cada columna con el fin de determinar su capacidad para capturar su proteína diana con una retención mínima de proteínas diana aguas abajo. La secuencia que mejor se ajusta a este criterio se usó como la secuencia de cascada lineal (SCL). Una vez que estuvieron disponibles los datos analíticos de los primeros ciclos, se probaron tres secuencias adicionales, y se añadió la columna de A1PI a los Escenarios 6 y 7.

## Materiales y equipos

Se usaron las resinas siguientes en las cascadas empaquetadas en columnas Pharmacia XK 50 (20 o 30 m de longitud):

Columna de plasminógeno: Pharmacia ECH-Lys-Sepharose FF, n.º de lote 243526.

Columna de fibrinógeno: ProMetic Purabead, (2 columnas en serie), n.º de lote CG1251 y n.º de lote CG1252.

Columna de IgG: ProMetic MAbsorbent A2P, n.º de lote FA0582-Z.

Columna de ASH: ProMetic Mimetic Blue SAHL P6XL, n.º de lote FA0500Z.

10 Columna de PON1/ApoA1: Peptide International, Toyopearl WWLHAN, n.º de lote 217772.

Columna de A1PI: Resina ProMetic 12/330 P6XL, n.º de lote CG 1255.

Todas las cromatografías se realizaron usando el sistema cromatográfico AKTA Explorer 100 con 950 colectores de fracciones (Amersham Biosciences). Se realizó ultrafiltración (UF)/ diafiltración (DF) con el sistema de ultrafiltración

15 Sartocon Slice 200 de Sartorius usando dos membranas de acetato de celulosa Hydrosart de 200 cm<sup>2</sup> (peso molecular de corte 10 kD).

## Procedimientos

- 20 Para cada ciclo, la carga para la primera columna fue plasma humano combinado + Tris 50 mM, pH 7,5 filtrado a 0,2 µm. El volumen de elución de cada columna se recogió en fracciones y se agrupó en base al perfil de absorbancia UV (A<sub>280</sub>) del cromatograma. Esta agrupación se usó como material de carga para la columna siguiente de la secuencia. Si la columna siguiente se iba a someter a un ciclo al día siguiente, el volumen de elución se filtraba de forma estéril (filtro de vacío de 0,2 µm) y se almacenaba a temperatura ambiente. En los Escenarios 6 y 7, se usó
- 25 UF/DF para reducir el volumen y realizar un intercambio de tampón en el volumen de elución agrupado como se indica en la Tabla 2 que se presenta a continuación. Esto era necesario para llevar el material de carga de A1PI en el tampón de migración de la columna de A1PI (fosfato sódico 15 mM, pH 6,1).

**Tabla 2: Secuencias de columna**

Escenario n.º 1	Pg → Fg → IgG → ASH → ApoA-1/PON1
Escenario n.º 2	IgG → Fg → Pg → ASH → ApoA-1/PON1
Escenario n.º 3	Pg → Fg → ASH → IgG
Escenario n.º 4	Pg → Fg → ApoA-1/PON1 → ASH → IgG
Escenario n.º 5	ApoA1/PON1 → Pg → Fg → ASH → IgG
Escenario n.º 6	Pg → Fg → ApoA1/PON1 → ASH → UF/DF → IgG → A1PI.
Escenario n.º 7	ApoA1/PON1 → Pg → Fg → ASH → IgG → UF/DF → A1PI

30

## Resultados

A continuación, se muestran las tablas y gráficas de rendimiento por etapa. N/A significa que los datos no estaban disponibles. < LOD significa que el nivel de proteína era inferior al límite de detección para ese ensayo en particular.

35

**Tabla 3: Rendimientos porcentuales por etapa para el Escenario n.º 1**

	Pg	Fg	IgG	ASH	ApoA1
VE Pg	4,6 %	98,9 %	96,0 %	101,7 %	91,8 %
VE Fg		0,0 %	94,5 %	90,8 %	84,9 %
VE IgG			3,0 %	78,3 %	84,5 %
VE ASH				2,8 %	81,9 %
VE PON1					N/A

La Tabla 3 resume los resultados del escenario n.º 1.

**Tabla 4: Rendimientos porcentuales por etapa para el Escenario n.º 2**

	IgG	Fg	Pg	ASH	ApoA1	A1PI
VE IgG	2,19 %	2,97 %	3,51 %	81,81 %	2,09 %	77,19 %
VE Fg		< LOD	< LOD	93,29 %	< LOD	89,01 %
VE Pg			< LOD	112,26 %	< LOD	113,34 %
VE ASH				1,00 %	< LOD	88,42 %
VE PON1					< LOD	1,00 %

La Tabla 4 resume los resultados del escenario n.º 2.

**5 Tabla 5: Rendimientos porcentuales por etapa para el Escenario n.º 3**

	Pg	Fg	ash	IgG	ApoA1	A1PI
VE Pg	3,47 %	90,06 %	86,14 %	89,61 %	86,05 %	85,68 %
VE Fg		1,01 %	81,67 %	70,80 %	70,20 %	75,03 %
VE ASH			22,74 %	74,39 %	73,74 %	61,34 %
VE IgG				6,82 %	1,37 %	67,40 %

La Tabla 5 resume los resultados del escenario n.º 3.

**Tabla 6: Rendimientos porcentuales por etapa para el Escenario n.º 4**

	Pg	Fg	ApoA1	ASH	IgG	A1PI
VE Pg	2,0 %	96,0 %	90,0 %	94,0 %	93,0 %	93 %
VE Fg		4,0 %	83,0 %	83,0 %	86,0 %	84 %
VE ApoA1			1,0 %	99,0 %	83,0 %	79 %
VE ASH				1,0 %	89,0 %	101 %
VE IgG					0,0 %	79 %

10

La Tabla 6 resume los resultados del escenario n.º 4.

**Tabla 7: Rendimientos porcentuales por etapa para el Escenario n.º 5**

	ApoA1	Pg	Fg	ASH	IgG
VE PON1	8,20 %	78,0 %*	N/A	89,10 %	93,10 %
VE Pg		0,10 %	62,00 %	87,70 %	86,60 %
VE Fg			2,50 %	73,80 %	72,20 %
VE ASH				5,00 %	60,80 %
VE IgG					0,70 %

\* con base en el ensayo de actividad, datos de nefelometría no disponibles

15 La Tabla 7 resume los resultados del escenario n.º 5.

**Tabla 8: Rendimientos porcentuales por etapa para el Escenario n.º 6**

	Pg	Fg	ApoA1	ASH	A1PI	IgG
VE Pg	2,00 %	91,48 %	82,09 %	89,67 %	81,29 %	89,06 %
VE Fg		22,90 %	75,10 %	104,50 %	103,12 %	106,60 %

	Pg	Fg	ApoA1	ASH	A1PI	IgG
VE PON1			< LOD	94,13 %	88,76 %	99,26 %
VE ASH				1,89 %	88,57 %	73,34 %
VE A1PI					< LOD	60,52 %
VE IgG					< LOD	< LOD

La Tabla 8 resume los resultados del escenario n.º 6.

**Tabla 9. Rendimientos porcentuales por etapa para el Escenario n.º 7**

	ApoA1	Pg	Fg	VE ASH	VE IgG	A1PI
ApoA1	25,4 %	73,6 %	78,5 %	75,9 %	76,0 %	63,7 %
Pg		< 2,6 %	85,5 %	88,7 %	87,6 %	85,4 %
Fg			9,5 %	71,4 %	72,8 %	57,9 %
VE ASH				3,7 %	42,1 %	58,7 %
VE IgG					< 0,2 %	54,8 %
A1PI						< 9,2 %

5

La Tabla 9 resume los resultados del escenario n.º 7.

### Conclusiones

- 10 En el ciclo anterior al escenario n.º 1 (misma secuencia que la del escenario n.º 1), el material de partida fue plasma filtrado sin ningún sistema tamponador añadido. A medida que se cargaba el plasma en la columna, había un pico sustancial en el pH del volumen de elución. Como consecuencia de esta observación, se añadió tampón Tris 1 M, pH 7,5, al plasma hasta una concentración final de Tris 50 mM antes de cargarlo en la primera columna. Véase el Ejemplo 3, que se presenta a continuación, para consultar un resumen del procedimiento de selección de tampón. Los
- 15 siete escenarios demostraron la viabilidad de utilizar una cascada lineal de columnas de afinidad como un procedimiento efectivo para purificar proteínas plasmáticas. Se analizaron los datos y se seleccionó la secuencia en base a las observaciones siguientes. En el Escenario 1, la recuperación de proteínas diana aguas abajo permaneció relativamente alta a lo largo del ciclo. En el escenario 2, la columna de IgG agotó prácticamente por completo la corriente de alimentación de plasminógeno, fibrinógeno y ApoA1. De nuevo, en el Escenario 3, la columna de IgG
- 20 capturó ApoA1. Con base en esta observación, se determinó que las columnas de PON1, Pg y Fg se debían colocar antes de la columna de IgG en la secuencia.

A la hora de decidir el orden de las etapas cromatográficas en la cascada lineal de acuerdo con este experimento, se tomaron en consideración los puntos siguientes:

- 25
- Las etapas de captura para PON1, Pg y Fg se deberían colocar antes de la de IgG.
  - Puesto que la albúmina y el citrato interferirán con la cromatografía de A1PI, la columna de A1PI se debería colocar después de la columna de albúmina. El volumen de elución requiere una etapa de procesamiento por UF/DF para un intercambio de tampón antes de la columna de A1PI.
  - La IgG se debería colocar antes de la albúmina para evitar pérdidas de IgG.

30

Por lo tanto, se eligió que la secuencia de cascada en este experimento fuera: PON1/ApoA1 → Plasminógeno → Fibrinógeno → IgG → ASH → UF/DF → A1PI.

35 Cabe señalar que, en otro experimento, se retiró la columna de PON1/ApoA1 de la secuencia de cascada actual y se introdujo vWF/FVIII antes del plasminógeno cuando la resina estaba disponible.

### Ejemplo 2: Captura por afinidad de proteínas plasmáticas

En este experimento se usó la secuencia de columnas siguiente:

40

vWF/FVIII → Plasminógeno → Fibrinógeno → IgG → UF/DF → ASH → UF/DF.

Preparación del plasma: Se obtuvieron cuatro litros de plasma combinado congelado a partir de un almacenamiento a -20 °C. Se descongeló la combinación de plasma a 37,0 °C ± 2 °C en un baño de agua. Una vez descongelado el plasma, se retiró rápidamente del baño de agua. Se ajustó el plasma a Tris 20 mM, NaCl 50 mM usando una dilución de 50x de Tris 1 M, pH 7,5, y una dilución de 40x de NaCl 2 M. Se mezcló bien el plasma y se filtró usando un filtro estéril Sartopure 300 PP2 (8 µm).

#### a. Captura por afinidad de factor de von Willebrand/factor VIII (vWF/FVIII)

10 Se preparó una columna de lecho empaquetado de 7 cm x 10,6 cm que contenía 410 mL del adsorbente de afinidad desarrollado para la captura por afinidad de vWF/FVIII. La columna se mantuvo habitualmente en una solución de almacenamiento que contenía NaOH 0,1 N cuando no se usaba durante periodos de tiempo prolongados. Se lavó la columna previamente almacenada con un caudal de 80 cm/h con 3 VC de agua Milli Q hasta que la conductividad cayó por debajo de 1 mS/cm. Se equilibró la columna con 4 VC de tampón de equilibrio (EQ) compuesto por Tris  
15 20 mM, citrato 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,5. Se aplicó el plasma filtrado a la columna. Cuando la absorbancia a 280 nm alcanzó el 5 % de las unidades de absorbancia de la escala completa (AUFS = 2), se recogió el efluente de volumen de elución.

Se lavó la columna con 4 VC de tampón EQ y se continuó recogiendo efluente de la columna hasta que la absorbancia  
20 cayó por debajo del 5 % de las AUFS. Se mezcló concienzuda, pero cuidadosamente, la solución y, a continuación, se filtró a través de un filtro Sartoclean CA (H8) de 3/0,8 µm seguido de un Sartobran P (H8) de 0,45/0,22 µm. El filtro se lavó posteriormente con 500 mL de tampón EQ. Se mezcló cuidadosamente el filtrado combinado. Esta solución filtrada constituyó la fracción de volumen de elución de la etapa de captura de vWF/FVIII (vWF/FVIII-VE (volumen de elución)). Se eluyó el vWF/FVIII 4 VC de tampón de elución compuesto por Tris 20 mM, NaCl 500 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM,  
25 polisorbato 80 al 0,01 %, etilenglicol al 30 %, pH 6,5. El caudal de la columna se fijó en 30 cm/h. Una vez que el % UV aumenta al 2 % de las AUFS, se inició la recogida de eluato. Se recogió el eluato de forma continua hasta que la absorbancia volvió a caer al 2 % de las AUFS. Se mezcló el eluato de la columna cuidadosamente y se almacenó a -80 °C hasta que estuvo preparado para su procesamiento adicional. La resina se regeneró con una solución CIP-1 compuesta por NaOH 0,5 N/Triton X100 al 1 %. Se aplicó la solución CIP-1 a la columna en la dirección de «flujo  
30 ascendente» a un caudal reducido de 5 mL/min durante aproximadamente 3 VC. A continuación, se lavó la resina con 2 VC de una solución CIP-2 compuesta por isopropanol al 30 % en NaOH 0,5 N a 5 mL/min. La resina se equilibró con 3 VC de solución de almacenamiento hasta su siguiente uso.

#### b. Captura por afinidad de plasminógeno (Pg)

35 Se preparó una columna de lecho empaquetado de 5 cm x 13 cm que contenía 255 mL del adsorbente de afinidad desarrollado para la captura de plasminógeno. La columna se mantuvo habitualmente en una solución de almacenamiento que contenía NaOH 0,1 N cuando no se usaba durante periodos de tiempo cortos. Se lavó la columna previamente almacenada con un caudal de 160 cm/h con 1-2 VC de agua Milli Q hasta que la conductividad cayó por  
40 debajo de 1 mS/cm. Se equilibró la columna con 3-4 VC de tampón de equilibrio (EQ) compuesto por Tris 20 mM, citrato 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,5. Se aplicó el vWF/FVIII-VE procedente de la etapa de captura anterior a la columna. Cuando la absorbancia a 280 nm alcanza el 5 % de las AUFS (unidades de absorbancia de la escala completa), se recogió el efluente de volumen de elución.

45 Se lavó la columna con 2-3 VC de tampón EQ y se continuó recogiendo el efluente de la columna hasta que la absorbancia cayó por debajo del 5 % de las AUFS. Se mezcló cuidadosamente la solución y, a continuación, se filtró a través de un filtro Sartobran de 0,22 µm. El filtro se lavó posteriormente con 500 mL de tampón EQ. Se mezcló cuidadosamente el filtrado combinado. Esta solución filtrada constituyó la fracción de volumen de elución de la etapa de captura de plasminógeno (Pg-VE). Se lavó la columna con 2 VC de tampón de lavado compuesto por caprilato  
50 30 mM en EQ, pH 7,5, seguido de 2 VC de tampón EQ. Se eluyó el plasminógeno con 2-3 VC de tampón de elución compuesto por fosfato de Na 50 mM, EACA 0,5 M, pH 7,0. Una vez que el % UV aumentó al 2 % de las AUFS, se inició la recogida de eluato. Se recogió el eluato de forma continua hasta que la absorbancia volvió a caer al 2 % de las AUFS. Se mezcló el eluato de la columna cuidadosamente y se almacenó a -80 °C hasta que estuvo preparado para su procesamiento adicional. La resina se regeneró con una solución CIP-1 compuesta por NaOH 0,5 N. Se aplicó  
55 la solución CIP-1 a la columna en la dirección de «flujo ascendente» a un caudal reducido de 40 mL/min durante aproximadamente 4 VC. La resina se equilibró con 3 VC de solución de almacenamiento hasta su siguiente uso.

#### c. Captura por afinidad de fibrinógeno (Fg)

Se preparó una columna de lecho empaquetado de 10 cm x 10,1 cm que contenía 790 mL del adsorbente de afinidad desarrollado para la captura de fibrinógeno. La columna se mantuvo habitualmente en una solución de almacenamiento que contenía NaOH 0,1 N cuando no se usaba durante periodos de tiempo cortos. Se lavó la columna previamente almacenada con un caudal de 60 cm/h con 1-2 VC de agua Milli Q hasta que la conductividad cayó por debajo de 1 mS/cm.

Se equilibró la columna con 3-4 VC de tampón de equilibrio (EQ) compuesto por Tris 20 mM, citrato 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,5. Se aplicó el Pg-VE procedente de la etapa de captura anterior a la columna. Cuando la absorbancia a 280 nm alcanzó el 5 % de las AUFS (unidades de absorbancia de la escala completa), se recogió el efluente de volumen de elución. Se lavó la columna con 4-5 VC de tampón EQ y se recogió el efluente de la columna de forma continua hasta que la absorbancia cayó por debajo del 5 % de las AUFS. Se mezcló cuidadosamente la solución y, a continuación, se filtró a través de un filtro Sartobran de 0,22 um. El filtro se enjuagó posteriormente con 500 mL de tampón EQ y se mezcló cuidadosamente el filtrado combinado. Esta solución filtrada constituyó la fracción de volumen de elución de la etapa de captura de fibrinógeno (Fg-VE). Se eluyó el fibrinógeno con 4-5 VC de tampón de elución compuesto por Tris 20 mM, citrato 20 mM, NaCl 140 mM, colato al 1 %, propilenglicol al 10 %, pH 7,5. Una vez que el % UV aumentó al 2 % de las AUFS, se inició la recogida de eluato. Se recogió el eluato de forma continua hasta que la absorbancia volvió a caer al 2 % de las AUFS. Se mezcló el eluato de la columna cuidadosamente y se almacenó a -80 °C hasta que estuvo preparado para su procesamiento adicional. La resina se regeneró con una solución CIP-1 compuesta por NaOH 1,0N. Se aplicó la solución CIP-1 a la columna en la dirección de «flujo ascendente» a un caudal reducido de 80 mL/min durante aproximadamente 4 VC. La resina se equilibró con 3 VC de solución de almacenamiento hasta su siguiente uso.

#### d. Captura por afinidad de inmunoglobulina G (IgG)

Se preparó la carga añadiendo 1/10 volúmenes de tampón de ajuste de carga (caprilato 300 mM en EQ) al Fg-VE y se mezcló bien. Se preparó una columna de lecho empaquetado de 14 cm x 12,2 cm que contenía 1 880 mL del adsorbente de afinidad desarrollado para la captura de IgG. La columna se mantuvo habitualmente en una solución de almacenamiento que contenía NaOH 0,1 N cuando no se usaba durante periodos de tiempo cortos. Se lavó la columna previamente almacenada con un caudal de 73 cm/h con 2 VC de agua Milli Q hasta que la conductividad cayó por debajo de 1 mS/cm. Se equilibró la columna con 2 VC de tampón de lavado compuesto por Tris 20 mM, citrato 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,5, seguido de 3-5 VC de tampón de equilibrio de IgG compuesto por caprilato 30 mM, tris 20 mM, citrato 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,5. Se aplicó el Fg-VE procedente de la etapa de captura anterior a la columna. Cuando la absorbancia a 280 nm alcanzó el 5 % de las AUFS (unidades de absorbancia de la escala completa), se recogió el efluente de volumen de elución.

Se lavó la columna con 4-5 VC de tampón de lavado y se continuó recogiendo el efluente de la columna hasta que la absorbancia cayó por debajo del 5 % de las AUFS. Se mezcló cuidadosamente la solución y, a continuación, se filtró a través de un filtro Sartobran de 0,22 um. El filtro se enjuagó posteriormente con 500 mL de tampón EQ y se combinó cuidadosamente el filtrado combinado. Esta solución filtrada constituyó la fracción de volumen de elución de la etapa de captura de IgG (IgG-VE). Antes de la elución de la IgG, se acondicionó la columna con 1 VC de tampón de preelución compuesto por citrato 50 mM, pH 6,0. Eluir la IgG con 4 VC de tampón de elución compuesto por citrato 50 mM, pH 3,0. Una vez que el % UV aumentó al 2 % de las AUFS, se inició la recogida de eluato. La recogida de eluato continuó hasta que la absorbancia volvió a caer al 2 % de las AUFS. Se mezcló cuidadosamente el eluato de la columna y se ajustó el pH por encima de 7,0 con un volumen suficiente de Tris Base 1 M y, a continuación, se almacenó a -80 °C hasta que estuvo preparado para su procesamiento adicional. La resina se regeneró con una solución CIP-1 compuesta por NaOH 1,0N. Se aplicó la solución CIP-1 a la columna en la dirección de «flujo ascendente» a un caudal reducido de 170 mL/min durante aproximadamente 4 VC seguida de 3 VC de agua Milli-Q en la dirección de flujo descendente. La resina se equilibró con 3 VC de solución de almacenamiento hasta su siguiente uso.

#### e. Ultrafiltración/Diafiltración

Se realizó filtración para concentrar el producto IgG-VE hasta que se alcanzó el volumen objetivo de aproximadamente 1,5-2 L. Se realizó diafiltración contra 6 volúmenes de tampón EQ con una presión de entrada del filtro (P1) de  $18 \pm 1$  psi y una PTM de  $15 \pm 1$  psi. Se tomaron muestras del permeado para realizar mediciones de pH y conductividad al comienzo de la diafiltración y a aproximadamente cada volumen de retenido de la diafiltración para monitorizar cuando era completa la diafiltración.

#### f. Captura por afinidad de albúmina (ASH)

60

Se preparó una columna de lecho empaquetado de 20 cm x 17,8 cm que contenía 5 600 mL del adsorbente de afinidad desarrollado para la captura de albúmina. La columna se mantuvo habitualmente en una solución de almacenamiento que contenía NaOH 0,1 N cuando no se usaba durante periodos de tiempo cortos. Se lavó la columna previamente almacenada con un caudal de 86 cm/h con 2 VC de agua Milli Q hasta que la conductividad cayó por debajo de 5 1 mS/cm. Se equilibró la columna con 3-4 VC de tampón EQ. Se aplicó el retenido de la UF/DF de la etapa anterior a la columna. Cuando la absorbancia a 280 nm alcanzó el 5 % de las AUFS (unidades de absorbancia de la escala completa), se recogió el efluente de volumen de elución.

Se lavó la columna con 2-3 VC de tampón EQ y se continuó recogiendo el efluente de la columna hasta que la absorbancia cayó por debajo del 5 % de las AUFS. Se mezcló la solución cuidadosamente. Esta solución filtrada constituyó la fracción de volumen de elución de la etapa de captura de albúmina (ASH-VE). Antes de la elución de la albúmina, se acondicionó la columna con 2 VC de tampón de preelución compuesto por citrato 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,5. Se eluyó la albúmina con 2-3 VC de tampón de elución compuesto por citrato de Na 50 mM, caprilato de Na 50 mM, pH 6,2. Una vez que el % UV aumentó al 2 % de las AUFS, se inició la recogida de eluato. Se recogió el eluato de forma continua hasta que la absorbancia volvió a caer al 2 % de las AUFS. Se mezcló el eluato de la columna cuidadosamente y, a continuación, se almacenó a -80 °C hasta que estuvo preparado para su procesamiento adicional. La resina se regeneró con una solución CIP-1 compuesta por NaOH 1,0N. Se aplicó la solución CIP-1 a la columna en la dirección de «flujo ascendente» a un caudal reducido de 400 mL/min durante aproximadamente 4 VC seguida de 3 VC de agua Milli-Q en la dirección de flujo descendente. La resina se equilibró con 3 VC de solución de almacenamiento hasta su siguiente uso.

**g. Concentración del volumen de elución de ASH**

Conectar la bolsa de ASH-VE que contiene el resto de la muestra a la entrada del tubo en el depósito de producto. Poner en marcha la bomba a un «caudal constante» de 1300 mL/min en el sistema Slice 200. Ajustar la presión en la salida del filtro (P2) a 13 ± 1 psi. Esto debería conducir a una presión de entrada (P1) del filtro de 18 ± 1 psi y una PTM de 15 ± 1 psi. Durante la concentración del producto, se alimentó ASH-VE adicional de forma continua al depósito del sistema. La concentración de ASH-VE continuó hasta que se alcanzó el volumen objetivo de aproximadamente 1,5-2 L. La recirculación continuó durante aproximadamente 1 minuto sin presión o filtración a través de la membrana antes de recoger el producto de UF del sistema de filtro. Se añadieron aproximadamente 500-1 000 mL de tampón de equilibrio al depósito para enjuagar el sistema de filtro. La recirculación comenzó lentamente para evitar la «formación de espumas» en el enjuagado del sistema durante aproximadamente de 3 a 5 minutos, sin filtración ni presión. El producto de UF se combinó, enjuagó y almacenó a -80 °C. El concentrado de ASH-VE se consideró un material de partida apropiado para la purificación de A1PI.

**Resultados**

**Tabla 10: Atributos clave para la captura de vWF/FVIII**

Muestra	Media	DE
<b>Carga:</b>		
Concentración de vWF (ug/mL)	10,88	1,34
Concentración de FVIII (ng/mL)	78,5	6,7
Volumen (L)	4061	116
pH	7,73	0,06
Conductividad (mS/cm)	15,6	0,5
<b>Volumen de elución:</b>		
Concentración de vWF (ug/mL)	1,09	0,39
Concentración de FVIII (ng/mL)	12,87	2,23
Volumen (L)	5597,1	87,5
pH	7,6	0,13
Conductividad (mS/cm)	17	0,577

<b>Elución:</b>		
Concentración de vWF (ug/mL)	26,8	5,48
Concentración de FVIII (ng/mL)	298,5	72,1
Volumen (L)	697,1	121,6
pH	8,47	0,56
Conductividad (mS/cm)	22,64	0,69

**Tabla 11: Atributos clave para la captura de plasminógeno**

Muestra	Media	DE
<b>Carga:</b>		
Títulos (g/L)	0,081	0,003
Vol (L)	5859	145
pH	7,75	0,09
Conductividad (mS/cm)	17,32	1,19
<b>Volumen de elución:</b>		
Títulos (g/L)	0,005	0,005
Vol (L)	6346	269
pH	7,71	0,07
Conductividad (mS/cm)	17,50	0,76
<b>Elución:</b>		
Títulos (g/L)	1,488	0,127
Vol (L)	236,3	17,5
pH	7,27	0,06
Conductividad (mS/cm)	14,71	3,68

**Tabla 12: Atributos clave para la captura de fibrinógeno**

Muestra	Media	DE
<b>Carga:</b>		
Títulos (g/L)	1,43	0,06
Vol (L)	6716	181
pH	7,72	0,04
Conductividad (mS/cm)	16,57	0,84
<b>Volumen de elución:</b>		
Títulos (g/L)	0,0323	0,005
Vol (L)	9507	231
pH	7,55	0,08
Conductividad (mS/cm)	17,00	0,96
<b>Elución:</b>		
Títulos (g/L)	3,433	0,253

<b>Elución:</b>		
Vol (L)	2539	227
pH	7,55	0,08
Conductividad (mS/cm)	14,00	1,41

**Tabla 13: Atributos clave para la captura de IgG**

<b>Muestra</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>
<b>Carga:</b>		
Títulos (g/L)	2,251	0,259
Vol (L)	10429	267
pH	7,54	0,25
Conductividad (mS/cm)	18,52	0,92
<b>Volumen de elución:</b>		
Títulos (g/L)	0,015	0,003
Vol (L)	12620	876
pH	7,61	0,09
Conductividad (mS/cm)	32,17	6,05
<b>Elución:</b>		
Títulos (g/L)	3,762	,481
Vol (L)	6086	741
pH	7,64	0,64
Conductividad (mS/cm)	10,64	6,55

**Tabla 14: Atributos clave para la captura de ASH**

<b>Muestra</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>
<b>Carga:</b>		
Títulos (g/L)	28,55	1,84
Vol (mL)	3814	211
pH	7,45	0,08
Conductividad (mS/cm)	17,21	1,75
<b>Volumen de elución:</b>		
Títulos (g/L)	0,047	0,003
Vol (mL)	10463	2015
pH	7,39	0,13
Conductividad (mS/cm)	17,42	1,79
<b>Elución:</b>		
Títulos (g/L)	18,27	2,47
Vol (mL)	5906	650
pH	6,76	0,04

<b>Elución:</b>		
Conductividad (mS/cm)	22,00	3,78

**Tabla 15: Rendimientos del procedimiento para proteínas diana**

Proteína	Tipo de ensayo	Rendimiento medio	Desv. est.
Factor de Von Willebrand	ELISA	43 %	12 %
Factor VIII	ELISA	65 %	11 %
Plasminógeno	Nefelometría	72 %	6 %
Fibrinógeno	Nefelometría	79 %	6 %
IgG	Nefelometría	87 %	7 %
ASH	Nefelometría	88 %	8 %
A1PI	Nefelometría	90 %	6 %

**Ejemplo 3: Evaluación y selección del sistema tamponador del plasma para uso en el procedimiento de cascada lineal**

Este experimento se realizó con el fin de determinar el sistema tamponador óptimo para el esquema de purificación de proteínas plasmáticas de secuencia de cascada lineal. Se observó que, durante la carga de la columna de IgG, el pH ascendía a 2 unidades por encima de el del plasma (pH ~ 7,5). Se observó un cambio de pH durante la carga de IgG varias veces y parecía ser dependiente del grado de reducción de proteína de la carga. Esto sugería que ciertas proteínas plasmáticas tienen capacidad tamponadora y la retirada de estas proteínas de la solución de carga puede aumentar la probabilidad de un cambio en el pH. Era necesario un sistema tamponador en el plasma para preservar la concentración y actividad de la proteína en el plasma. El sistema tamponador debía ser tal que el pH permaneciera en un intervalo aceptable de aproximadamente  $7,5 \pm 0,4$  a lo largo de todo el procedimiento.

Para garantizar que no se produjera un cambio de pH en el ciclo posterior, se tamponó la carga de plasma para la operación siguiente usando una solución madre de Tris 1 M a pH 7,5. Esta solución madre de tampón se creó usando dos soluciones madre individuales, Tris Base 1 M y Tris HCl 1 M. Estos tampones se valoraron entre sí a pH 7,5. A continuación, se diluyó la solución madre de tampón 1:20 en plasma antes de su filtración. La carga final preparada contenía plasma ajustado con Tris 50 mM, filtrado con un filtro de 0,45/0,2  $\mu\text{m}$ . Este sistema tamponador se usó para la determinación de los experimentos de secuencia de cascada lineal (SCL) 1-7. Se usó tampón Tris 50 mM en el plasma y tampón de migración a lo largo de todo el procedimiento. No se observaron problemas de pH durante la carga de la columna cuando se usaba Tris 50 mM, pH 7,5. La Tabla 15 resume los rendimientos por etapa de las purificaciones SCL realizadas usando Tris 50 mM, pH 7,5, como tampón del plasma.

**Tabla 15: Rendimiento porcentual por etapa de las proteínas diana a lo largo de las SCL tamponadas con Tris 50 mM, pH 7,5.**

Tampón Tris 50 mM	Fg	FXIII	IgG	A1PI	A1PI (actividad)
Pg	95 $\pm$ 2,7 (n = 6)	91,3 $\pm$ 7,4 (n = 4)	98 $\pm$ 3,7 (n = 7)	100 $\pm$ 13 (n = 7)	100,3 $\pm$ 15,8 (n = 5)
Fg			86,6 $\pm$ 8 (n = 7)	95,5 $\pm$ 5,3 (n = 7)	107,7 $\pm$ 9,1 (n = 5)
IgG				87,8 $\pm$ 13,3 (n = 7)	96,7 $\pm$ 7,4 (n = 5)
ASH				96,1 $\pm$ 19,5 (n = 7)	98,5 $\pm$ 23 (n = 4)

Se buscó un sistema tamponador alternativo debido a los relativamente altos costes proyectados del tampón Tris 50 mM a escala de fabricación. Se realizaron varios experimentos sobre alícuotas pequeñas de plasma tamponado con bicarbonato, fosfato y Tris a pH 7,5. Estos experimentos se llevaron a cabo durante el curso de varios días para simular la SCL en múltiples días. Se tamponaron alícuotas del mismo combinado de plasma y se dejaron incubar a

temperatura ambiente (TA) durante varios días. Las muestras de cada una se analizaron para determinar la actividad y concentración de proteína. En la Tabla 16 se presentan los rendimientos por etapa de incubación cuando el plasma está tamponado con cada sistema. El plasma tamponado con Tris 50 mM se realizó varias veces como valor de referencia para su comparación.

5

**Tabla 16: Resumen de los estudios de tamponamiento de plasma preliminares.**

Rendimientos después de la incubación a TA						
	FG	FG (act)	FXIII (act)	IgG	A1PI	A1PI (ac)
En plasma tamponado con Tris 50 mM, t = 24 h	100 % (n = 2)	99 % (n = 2)	100 % (n = 2)	95 % (n = 2)	101 % (n = 2)	98 % (n = 2)
En plasma tamponado con bicarbonato sódico 20 mM, t = 24	113,00 %	99,00 %	104,00 %	108,00 %	97,00 %	84,00 %
En plasma tamponado con bicarbonato sódico 50 mM, t = 24	98,00 %	114,00 %	115,00 %	102,00 %	97,00 %	97,00 %
En plasma tamponado con fosfato sódico 50 mM, t = 24 h	96,00 %	95,00 %	95,00 %	99,00 %	97,00 %	103,00 %
En plasma tamponado con fosfato sódico 50 mM, t = 48 h (el rendimiento se presenta en forma de t = 24 a t = 48 h)	109,00 %	99,00 %	100,00 %	100,00 %	100,00 %	97,00 %

Los resultados indican que no había mayor pérdida de proteína o actividad con los diversos tampones probados en comparación con el control, agua. Ninguna de las proteínas diana se vio afectada negativamente por la adición de un agente tamponador al plasma. Cada esquema de tamponamiento se probó, a continuación, en un estudio de cascada para determinar las condiciones de tamponamiento óptimas.

10

Durante los experimentos SCL, se evaluó un sistema tamponador de fosfato sódico 10 mM. Durante la preparación de la carga de plasma, se diluyó una solución madre de fosfato de Na 0,2 M a fosfato de Na 10 mM con una dilución de la solución madre de tampón de 20 veces con plasma. El plasma tamponado con fosfato 10 mM se filtró a 0,2  $\mu$ m antes de su uso en el estudio de cascada lineal. Durante el estudio de este esquema de tamponamiento, la actividad de la proteína fue notablemente inferior para las proteínas diana y otros factores que eran indicativos de actividad proteica. La Tabla 17, que se presenta a continuación, resume los rendimientos por etapa de varios ciclos SCL usando tampón fosfato 10 mM.

20

**Tabla 17: Rendimiento porcentual por etapa de las proteínas diana a lo largo de las SCL tamponadas con fosfato sódico 10 mM, pH 7,5.**

Tampón fosfato 10 mM	Fg	FXIII	IgG	A1PI	A1PI (actividad)
Pg	94 $\pm$ 3,5 (n = 6)	80,4 $\pm$ 7,4 (n = 5)	96,9 $\pm$ 5,1 (n = 6)	97,3 $\pm$ 6,2 (n = 6)	95,5 $\pm$ 7,8 (n = 6)
Fg			78,2 $\pm$ 5,5 (n = 6)	90,9 $\pm$ 8 (n = 6)	89,5 $\pm$ 25 (n = 5)
IgG				87,2 $\pm$ 7,4 (n = 5)	80 $\pm$ 21 (n = 4)
ASH				94 $\pm$ 8,1 (n = 3)	ND

Aunque el plasma tamponado con Tris 50 mM había resultado un éxito a la hora de evitar fluctuaciones de pH, era necesario un medio de tamponamiento del plasma con una mejor relación entre coste y eficacia. Como consecuencia,

25

se usó Tris 20 mM, pH 7,5, para la SCL. Se ajustó el plasma a Tris 20 mM a pH 7,5 mediante una dilución de 50 veces de Tris 1 M, pH 7,5. Esta solución madre de tampón se fabricó como se ha indicado anteriormente, valorando Tris base con Tris HCl. La Tabla 18 muestra que el comportamiento de los ciclos SCL usando plasma valorado a Tris 20 mM es comparable con el del tampón Tris 50 mM como se ha descrito anteriormente en términos de recuperaciones de proteína diana, capacidad tamponadora y estabilidad de carga.

**Tabla 18: Rendimiento porcentual por etapa de las proteínas diana a lo largo de las SCL tamponadas con Tris 20 mM, pH 7,5.**

Tampón Tris 20 mM	Fg	FXIII	IgG	A1PI	A1PI (actividad)
Pg	97 ± 5,6 (n = 8)	88,7 ± 17 (n = 8)	103,2 ± 13,4 (n = 8)	99,3 ± 8 (n = 8)	104,3 ± 13 (n = 4)
Fg			86,4 ± 7,1 (n = 8)	90 ± 6,2 (n = 8)	90 ± 12 (n = 4)
IgG				87,1 ± 3,2 (n = 7)	91,7 ± 7 (n = 3)
ASH				95 ± 6,8 (n = 6)	88,2 ± 19 (n = 3)

**10 Tabla 19: Rendimientos por etapa de ASH a lo largo de las SCL usando diferentes sistemas tamponadores.**

ASH con diversos tampones	Tris 50 mM	Fosfato 10 mM	Tris 20 mM
Pg	97,4 ± 3,9 (n = 6)	95,5 ± 4,3 (n = 6)	95,6 ± 8,1 (n = 8)
Fg	95 ± 5,7 (n = 6)	94,8 ± 9,2 (n = 6)	97,8 ± 4,6 (n = 7)
IgG	84 ± 9,8 (n = 6)	79,1 ± 18,3 (n = 5)	86,4 ± 2,1 (n = 7)
<b>Rendimiento general</b>	<b>77,4</b>	<b>71,6</b>	<b>80,1</b>

La Tabla 19 representa los resultados de una comparación entre los sistemas tamponadores evaluados en términos de rendimientos de etapa de ASH a lo largo de las SCL. En general, las recuperaciones por etapa para la captura de ASH entre tres tampones probados fueron comparables entre sí, excepto con fosfato 10 mM, se demostró un rendimiento inferior para la ASH con etapa de captura de IgG. Asimismo, la IgG, una proteína diana de valor superior, presentó una recuperación inferior durante la etapa de captura de fibrinógeno cuando se aplicó tampón fosfato 10 mM. Todos los valores fueron rendimientos porcentuales indicados para cada etapa de captura. Los datos se recopilaron de ciclos de 0,5 L, las recuperaciones por etapa se calcularon únicamente en base a la cantidad de albúmina presente en la carga y el volumen de elución.

Se concluyó que un tampón que contuviera Tris 50 mM era un tampón efectivo del plasma que puede resultar demasiado costoso a medida que el procedimiento se amplía a escala de fabricación. Se evaluaron y sometieron a ciclos SCL completos varias alternativas al Tris. Estas alternativas se juzgaron en base a la capacidad tamponadora, facilidad de uso, coste y conservación de la concentración y actividad de proteína. Se encontró que un Tris de molaridad reducida (20 mM) a pH 7,5 era efectivo como tampón del plasma.

#### LISTADOS DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1

30 Aminoácido  
ARQFDF

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de aislamiento y purificación secuencial de proteínas que comprende (i) proporcionar una muestra de plasma, (ii) proporcionar ligandos que se unan, cada uno de ellos, específicamente a una proteína diana de la muestra biológica, donde cada uno de los ligandos está opcionalmente fijado a un soporte para formar complejos ligando-soporte, (iii) poner en contacto los ligandos o complejos ligando-soporte, secuencialmente y en un orden predeterminado, con la muestra de plasma para permitir que cada ligando o complejo ligando-soporte una selectivamente la proteína diana de la muestra de plasma, donde el orden predeterminado de puesta en contacto los ligandos o complejos ligando-soporte con la muestra de plasma deriva en la unión de plasminógeno antes de IgG y de IgG antes de albúmina, y donde, antes de dicha puesta en contacto, la muestra biológica no se procesa mediante una etapa de preacondicionamiento seleccionada del grupo que consiste en precipitación con alcohol, crioprecipitación, eliminación de lípidos y/o proteínas lipídicas, precipitación de euglobulina, o una combinación de las mismas, (iv) eluir la proteína diana unida a cada uno de los ligandos o complejos ligando-soporte, y (v) aislar la proteína diana secuencialmente de la muestra biológica.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde las proteínas diana comprenden fibrinógeno, inhibidor de la proteinasa alfa-1, apolipoproteína A1, inmunoglobulinas, paraoxonasa, factores de coagulación, vWF/FVIII, albúmina, plasminógeno, o una combinación de los mismos.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, donde se aísla fibrinógeno del plasma antes de IgG.
4. El procedimiento de la reivindicación 2, donde la actividad de paraoxonasa se retiene en la muestra biológica durante el aislamiento de la proteína.
5. El procedimiento de la reivindicación 2, donde se aísla vWF/FVIII del plasma antes de plasminógeno.
6. El procedimiento de la reivindicación 2, donde se aísla apolipoproteína A1 del plasma antes de IgG.
7. El procedimiento de la reivindicación 2, donde se aísla inhibidor de la proteinasa alfa-1 del plasma después de albúmina.
8. El procedimiento de la reivindicación 2, donde se aísla plasminógeno del plasma antes de fibrinógeno.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el ligando comprende un péptido, un polipéptido, un peptidomimético, una molécula pequeña, colorante, un compuesto que contienen triazina, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, una molécula a base de ácidos nucleicos, una molécula no a base de polipéptidos o nucleótidos, un carbohidrato, miméticos de carbohidratos, lípidos, un material inorgánico, un inhibidor, un sustrato o cualquier combinación de los mismos.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, donde los ligandos comprenden péptidos que consisten en de 3 a 5, 8, 10 o 15 aminoácidos.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el soporte comprende un material sintético, un material natural, o ambos.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el soporte comprende agarosa, poli(acrilamida), dextrano, celulosa, polisacárido, nitrocelulosa, sílice, alúmina, óxido de aluminio, dióxido de titanio, óxido de titanio, circonita, estireno, difluoruro de polivinilo nailon, copolímero de estireno y divinilbenceno, éster de polimetacrilato, polímero o copolímero de azlactona derivatizada, vidrio, celulosa, agarosa, derivados de cualquiera de los anteriores y combinaciones de cualquiera de los anteriores.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el soporte es un lecho de resina.
14. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el plasma se trata mediante un agente tamponador antes de la etapa de puesta en contacto con el fin de conservar adicionalmente la concentración y actividad de uno o más agentes diana en la muestra de plasma.