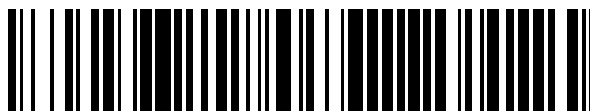


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 780 367**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 1/16</b>	(2006.01) <b>B01D 15/12</b>	(2006.01)
<b>C07K 1/18</b>	(2006.01) <b>B01D 15/42</b>	(2006.01)
<b>C07K 1/20</b>	(2006.01)	
<b>C07K 19/00</b>	(2006.01)	
<b>C07K 14/76</b>	(2006.01)	
<b>B01D 15/32</b>	(2006.01)	
<b>B01D 15/36</b>	(2006.01)	
<b>C07K 14/765</b>	(2006.01)	
<b>C07K 1/34</b>	(2006.01)	
<b>C07K 1/36</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.01.2016 PCT/IB2016/050001**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2016 WO16108211**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.01.2016 E 16732884 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3240798**

54 Título: **Nuevo método de purificación eficiente de albumina sérica humana**

30 Prioridad:

**01.01.2015 IN 3228CH2014**

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

**25.08.2020**

73 Titular/es:

**SHILPA MEDICARE LIMITED (100.0%)  
No.12-6-214/A1, Hyderabad Road, Raichur  
Karnataka 584135, IN**

72 Inventor/es:

**KARUR, RAJYASHRI RAMAKRISHNA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 780 367 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

Nuevo método de purificación eficiente de albumina sérica humana

**Campo técnico de la invención**

- 5 La presente invención describe un método de purificación simple y rentable de albúmina sérica humana recombinante de diferentes fuentes. Más particularmente, la presente invención se refiere a una mejora del método que potencia la recuperación de la proteína en cada etapa de purificación.

**Antecedentes de la invención**

- 10 La albúmina sérica humana es la proteína monomérica soluble, globular y no glicosilada más abundante en plasma humano con un peso molecular de 66,437 a 66,600 Dalton. Contiene una única cadena de polipéptidos no glicosilados de 585 aminoácidos y también contiene 17 puentes disulfuro y un grupo tiol libre. Actúa como una molécula transportadora y se une a medicamentos, pigmentos, ácidos grasos, iones metálicos y otras proteínas. También transporta hormonas, ácidos grasos y otros compuestos, amortigua el pH y mantiene la presión osmótica. La albúmina sérica humana se utiliza para reemplazar el líquido perdido y ayudar a restaurar el volumen de sangre en pacientes con traumatismos, quemaduras y cirugía.

La demanda del mercado de albúmina sérica humana se estima en más de 500 toneladas por año en todo el mundo. Actualmente, la producción comercial de albúmina sérica humana se basa principalmente en plasma humano recolectado, que tiene un suministro limitado, pero de alta demanda clínica.

- 20 La albúmina sérica humana recombinante se produce en levaduras que incluyen *Pichia*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, arroz y otros organismos. La proteína recombinante se podría producir cultivando plantas transgénicas en campos o invernaderos o por fermentación de diferentes microorganismos. La proteína así producida necesita ser purificada a través de una serie de etapas para finalmente lograr un grado de pureza que es equivalente o mejor que la albúmina plasmática. Uno de los mayores desafíos en la producción de albúmina es el grado de pureza que se requiere alcanzar. Mientras que la mayoría de las proteínas recombinantes necesitan ser purificadas de manera que el producto final tiene <100ppm de proteínas de la célula huésped (HCP, por sus siglas en inglés), la albúmina recombinante, que se utiliza en dosis altas, debe tener <100ppb (partes por billón) de HCP en el producto final. Por lo tanto, se requiere una pureza mil veces mayor para la albúmina recombinante en comparación con otras recombinantes bioterapéuticas.

- 30 La purificación de la proteína para obtener, en forma pura, y para homogeneizar, libre de: material colorante o pigmento, proteínas de la célula huésped, ADN de la célula huésped, polisacáridos, lípidos, iones metálicos, productos de degradación y agregación de albúmina y albúmina glicosilada. Además, el tiol libre de Cis 34, que funciona como un secuestrante de radicales libres y participa en el desempeño de funciones antioxidantes, así como en el transporte de fármacos y otras moléculas, necesita mantenerse en su forma reducida.

- 35 Dado que la albúmina tiende a unirse a muchas de las impurezas presentes en el caldo, los métodos desarrollados para la purificación de esta proteína son complicados, implican una gran cantidad de etapas, lo que aumenta el coste y reduce la recuperación final del producto.

- 40 Hay muchas técnicas descritas para la purificación de la albúmina sérica humana recombinante en literatura de patente y no patente. Sin embargo, estos métodos implican etapas complicadas y múltiples, que pueden generar costes adicionales para el método. El número de etapas en la técnica anterior da como resultado una recuperación final reducida contribuyendo a aumentar el coste del producto.

- 45 La solicitud de patente CN101768206 titulada "*Método para la purificación de albúmina sérica humana recombinante y aplicación del mismo*" describe un método para purificar la proteína de albúmina sérica humana recombinante. Este método incluye las etapas de procesar el líquido fermentado que contiene albúmina sérica humana recombinante mediante una membrana cerámica, purificar el líquido sobrenadante mediante cromatografía de intercambio de cationes con alto contenido de sal, cromatografía de intercambio de capas hidrófobas y cromatografía de intercambio aniónico débil. La proteína obtenida se puede utilizar para producir vacunas para humanos contra virus con un método de cultivo celular, particularmente vacunas contra la rabia. Sin embargo, la presente invención es silenciosa con respecto a la pureza y la recuperación de la proteína purificada.

- 50 La Solicitud de Patente EP0570916 A2 titulada "*Albúmina sérica humana recombinante, método para producir la misma preparación farmacéutica que contiene la misma*" describe la purificación de la albúmina sérica humana mediante secuencia de etapas que incluyen ultrafiltración, tratamiento térmico, tratamiento con ácido y otra ultrafiltración, seguido de posteriores tratamientos con un intercambiador de cationes, un transportador de cromatografía hidrofóbica y un intercambiador de aniones, y mediante extracción con sales de modo que se obtiene una forma pura de albúmina sérica humana que no contiene contaminantes proteicos ni polisacáridos y se formula en una preparación farmacéutica. Este método es eficiente para purificar albúmina sérica humana recombinante y para proporcionar albúmina sérica humana sustancialmente pura, que no contiene sustancias relacionadas con el huésped

y otros contaminantes y está suficientemente libre de coloración. Sin embargo, la invención implica muchas etapas de purificación con una recuperación final del producto baja.

5 La solicitud de patente EP0699687 B1 titulada "*Método para la purificación de albúmina sérica humana recombinante*" describe un método para purificar la albúmina sérica humana recombinante calentando un medio de cultivo que contiene albúmina sérica humana recombinante y las células huésped que producen esta proteína, alimentando la solución calentada en sentido ascendente en un lecho fluido en el que las partículas adsorbentes se suspenden para efectuar el contacto con las partículas adsorbentes a un valor de pH de aproximadamente 3 a 5 y después recuperando la fracción adsorbida que contiene la proteína recombinante. La solución se calienta en presencia de un agente reductor y después se somete a al menos un tratamiento de purificación seleccionado de un grupo que consiste en cromatografía de interacción hidrofóbica, tratamiento con intercambiador de aniones, tratamiento con resina quelante, tratamiento con ácido bórico/borato y ultrafiltración. La invención puede dar como resultado una mayor pureza de la proteína.

15 La solicitud de patente US20030204060 titulada "*Método para la purificación de albúmina sérica*" describe la purificación de la albúmina sérica humana recombinante que consiste en una serie de etapas, opcionalmente mediante incubación con un adsorbente de intercambio aniónico, seguido de cromatografía de afinidad que emplea una fase sólida hidrofóbica y que utiliza un anión lipídico soluble en agua como desorbentes en la fase acuosa. La fase inmóvil comprende un transportador acoplado a un ácido 2-mercapto o 2-hidroxi-alcanoico. La proteína purificada por este método es más de 99.9% pura, particularmente más de 99.95% pura.

20 Por lo tanto, también es necesario desarrollar un método para la purificación de la albúmina humana recombinante, que da como resultado una proteína altamente purificada a través de etapas mínimas mientras se optimiza la etapa para aumentar el rendimiento de cada etapa.

También existe la necesidad de una etapa de purificación, que sea rentable para la producción a gran escala de albúmina sérica humana recombinante.

#### 25 **Objetivos de la invención**

El objetivo de la presente invención es proporcionar un método para la purificación de albúmina sérica humana recombinante en un número mínimo de etapas.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para la purificación de albúmina sérica humana recombinante que sea rentable.

30 Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar un método para la purificación de la albúmina sérica humana recombinante que da como resultado una alta pureza de la proteína recuperada.

Otro objetivo más de la presente invención es optimizar el método de modo que la proteína se purifique a través del mínimo número de etapas con rendimiento incrementado de cada etapa.

35 Otro objetivo más de la presente invención es optimizar el método a través de una secuencia de etapas que asegura la finalización de la purificación desde la clarificación hasta el embotellado en menos de dos días.

#### **Compendio de la invención**

40 La presente invención describe un método de purificación simple y rentable para la albúmina sérica humana recombinante. El método da como resultado una proteína altamente purificada con un número limitado de etapas de purificación. La presente invención también se refiere a una mejora del método de modo que la recuperación de la proteína aumenta en cada etapa de purificación.

45 La albúmina sérica humana recombinante producida mediante fermentación está sometida a purificación. El caldo de fermentación generalmente se selecciona de bacterias, hongos, células de mamíferos u homogeneizado de plantas transgénicas que producen albúmina humana recombinante. Las células se separan del caldo de fermentación y se someten a centrifugación. El sobrenadante libre de células se microfiltra utilizando filtros de fibra hueca de 0.1-0.45 micras. La muestra microfiltrada se concentra y el caldo se diafiltra contra agua utilizando filtros de fibra hueca en modo continuo hasta que la conductividad es inferior a 3 mS/cm. La muestra diafiltrada se carga en una columna de intercambio catiónico mediante un ajuste de pH en línea a 4.5 utilizando 2% de tampón de acetato de sodio 1M. El eluyente de esta etapa se somete a cromatografía de interacción hidrofóbica, que emplea polipropilenglicol (PPG), en modo de flujo pasante.

50 El flujo pasante y el lavado a partir de la purificación en HIC se diafiltra y se carga en resina de intercambio aniónico para cromatografía. La proteína así eluida se concentra a 200 mg/ml y se diafiltra contra agua. El producto final concentrado se lleva a tampón fosfato 20 mM, pH 7.0, cloruro sódico 144 mM y caprilato sódico 8 mM mediante la adición de volúmenes apropiados de sus soluciones madre. La proteína se filtra estéril y se embotella. La proteína embotellada se somete a pasteurización final a una temperatura de 60°C durante 1-10 h.

Las series finales del método se combinan de modo que haya una transición simple de una etapa a la siguiente, reduciendo así el tiempo total del método. Todo el método de purificación se completa en dos días desde el cultivo hasta el producto final.

- 5 La proteína purificada tiene un color de incoloro a amarillo pálido con un coeficiente de de tiol  $> 0.75$ , agregados  $<2\%$ , características fisicoquímicas y de unión de la albúmina estándar.

La presente invención hace que el método sea comercialmente rentable.

### Breve descripción de los dibujos

Esta invención se ilustra en los dibujos adjuntos.

- 10 La FIG.1 ilustra un diagrama de flujo de un método de purificación de albúmina sérica humana recombinante.
- La FIG.2 ilustra el resultado de SDS PAGE de fracciones obtenidas a partir de cromatografía de intercambio catiónico cargadas en 10% de gel de SDS PAGE y sometidas a tinción con coomassie.
- La FIG.3 ilustra la separación de agregados y productos de degradación en PPG como se ve en SEC-HPLC utilizando la columna BioSep s2000.
- 15 La FIG.4 ilustra las diferentes fracciones obtenidas en el fraccionamiento de albúmina sérica humana en PPG cargado en 10% de gel de SDS-PAGE. La FIG.4 también muestra el efecto de añadir caprilato y cisteína sobre la recuperación mejorada de la proteína en el flujo pasante/lavado.
- La FIG.5 ilustra el SDS PAGE del producto purificado final después de la cromatografía de intercambio aniónico.
- 20 La FIG.6 ilustra la masa intacta de la albúmina sérica humana recombinante final en comparación con la albúmina estándar.
- La FIG.7 ilustra la PAGE nativa, la SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras y la transferencia Western de albúmina recombinante hibridada con anticuerpo de albúmina antihumana en comparación con la albúmina estándar.
- 25 La FIG.8 ilustra los resultados de la comparación de diferentes tipos de espectros de albúmina sérica humana recombinante con albúmina estándar.
- La FIG.9 ilustra los perfiles HPLC de la albúmina sérica humana recombinante purificada final en SEC-HPLC y RP-HPLC.
- La FIG.10 ilustra la manera de cargar el caldo después de la diafiltración en la columna de intercambio catiónico.
- 30 La FIG.11 ilustra la manera de cargar el caldo, después del tratamiento térmico, en la columna de intercambio catiónico.
- La FIG.12 ilustra el compendio del método seguido para la cromatografía de intercambio catiónico.
- La FIG.13 ilustra la reducción consistente de pigmento al final de la cromatografía de intercambio catiónico.
- La FIG.14 ilustra las especificaciones de la albúmina humana recombinante purificada final obtenida utilizando el procedimiento descrito para la purificación.

### 35 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para la purificación de albúmina humana recombinante; el método (100) comprende las etapas de:

- a. separar la pluralidad de células del caldo de fermentación o del cultivo mediante centrifugación (101);
- b. microfiltrar el sobrenadante libre de células obtenido (102);
- 40 c. concentrar el sobrenadante microfiltrado y diafiltrar contra agua (103);
- d. cargar la muestra diafiltrada en una columna de intercambio catiónico para purificación en modo de unión y elución (104);
- e. separar la albúmina monomérica de los agregados y productos de degradación mediante cromatografía de interacción hidrofóbica mediante la adición de cisteína 5-30 mM y caprilato 5-30 mM en modo de flujo pasante
- 45 (105);
- f. reunir el flujo pasante y el lavado y diafiltrarlo contra agua (106);

- g. cargar la albúmina en resina de intercambio aniónico para cromatografía en modo de unión y elución (107);
- h. concentrar la proteína eluida y diafiltrar contra agua (108); y
- i. filtrar la proteína estéril y someterla a pasteurización a una temperatura de 60°C durante 1-10 horas (109).

5 A fin de describir y señalar de manera más clara y concisa el objeto de la invención reivindicada, se proporcionan las siguientes definiciones para términos específicos, que se utilizan en la siguiente descripción escrita.

El término "*albúmina sérica humana recombinante*" se refiere a la albúmina sérica humana producida mediante tecnología de ADN recombinante.

10 El término "*purificación de proteínas*" se refiere a una serie de etapas destinadas a aislar una o algunas proteínas de una mezcla compleja, generalmente células, tejidos u organismos completos o caldo de fermentación.

El término "*SDS-PAGE*" se refiere a una electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés), una técnica para separar proteínas basada en su capacidad para moverse dentro de una corriente eléctrica, que es en función de la longitud de sus cadenas de polipéptidos o de su peso molecular.

15 El término "*cromatografía de intercambio catiónico*" se refiere a una forma de cromatografía de intercambio iónico que utiliza resinas o rellenos con grupos funcionales que separan los cationes. Esto puede incluir filtros con grupos funcionales que separan cationes.

El término "*microfiltración*" se refiere a un método de filtración física donde se pasa un fluido a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.1-0.45 micras para separar células, restos celulares, partículas suspendidas u otros componentes que son mayores de 0.1-0.45 micras en tamaño, del líquido del método.

20 La presente invención describe un método para la purificación de albúmina sérica humana recombinante.

25 La FIG.1 ilustra un diagrama de flujo para un método de purificación de albúmina sérica humana recombinante. El método (100) de purificación comienza con (101) la separación de las células del caldo de fermentación de cualquier fuente cultivada utilizando cualquier organismo. El caldo de fermentación generalmente se selecciona del grupo que consiste en bacterias, hongos, células de mamíferos u homogeneizado de plantas transgénicas que producen albúmina humana recombinante. El caldo se diluye con un volumen igual de agua y se centrifuga. La proteína, opcionalmente, se puede someter a tratamiento térmico a una temperatura de 60°C durante 1-2 horas para la inactivación viral o la prevención de la actividad de la proteasa ácida antes de proceder a la siguiente etapa de microfiltración. Sin embargo, esta etapa es opcional.

30 En la etapa (102), el sobrenadante libre de células obtenido después de la centrifugación se somete a microfiltración utilizando filtros de fibra hueca. El caldo resultante está completamente libre de partículas y restos celulares. En la etapa (103), la muestra microfiltrada se concentra y se diafiltra contra agua para lograr una conductividad de menos de 3 mS/cm. En la etapa (104), la muestra diafiltrada se purifica mediante cromatografía de intercambio catiónico. El pH de la muestra se ajusta en línea a 4.5 y se carga en resina de intercambio catiónico. El tiempo de residencia de la proteína se incrementa gradualmente para que se cargue un total de 140-230 mg de proteína por ml de resina. La proteína se eluye con fosfato de sodio 60 mM, pH 5.8 con caprilato de sodio 10 mM. La adición de ácidos grasos tal como el caprilato al tampón de elución mejora significativamente la recuperación, reduce la agregación y da como resultado la reducción del pigmento. En la etapa (105), la proteína se somete a cromatografía de interacción hidrofóbica, que emplea polipropilenglicol (PPG), una resina con diferente selectividad a las otras resinas HIC, para separar los agregados y el producto de degradación de 45 kDa de la albúmina sérica humana recombinante. En la etapa (106), la proteína acumulada del flujo pasante y el lavado de la etapa anterior se concentra a 50 mg/ml y se diafiltra contra agua. En la etapa (107), el pH de la muestra se ajusta a 7.0 y se carga en resina de intercambio aniónico para cromatografía. En la etapa (108), la proteína se eluye de la resina de intercambio aniónico con acetato de sodio, pH 4.5. La proteína eluida se ajusta a pH 7.0 y se diafiltra contra agua. Esta proteína se concentra a 200 mg/ml y se diafiltra contra agua. El tampón de fosfato de sodio pH 7.0, cloruro de sodio y caprilato de sodio se añaden a una concentración final de 20 mM, 144 mM y 8 mM respectivamente. En la etapa (109), la proteína concentrada se filtra estéril y se embotella. La proteína embotellada se somete a pasteurización a una temperatura de 60°C durante 1-10 h.

Según el método de la presente invención, dicha carga de muestra filtrada en la resina de intercambio catiónico se realiza mediante un aumento gradual en el tiempo de residencia, lo que permite aumentar la capacidad de carga en un 75-150% por encima de la capacidad de unión marcada de la resina.

50 El método según la presente invención permite un aumento en la recuperación de la proteína de albúmina en la acumulación del flujo pasante y del lavado a > 87% en HIC en modo flujo pasante.

Las series finales del método se combinan de modo que haya una transición fácil de la última etapa a la siguiente. Esto da como resultado una reducción del tiempo para completar el método. Todo el método de purificación se completa en dos días desde el cultivo hasta que se obtiene el producto final. Esto hace que el método sea rentable y comercialmente viable.

La FIG.2 ilustra el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS PAGE) de fracciones obtenidas de la cromatografía de intercambio catiónico cargadas en 10% de gel de SDS PAGE y sometidas a tinción de coomassie. La muestra diafiltrada se carga en una columna de intercambio catiónico mediante un ajuste de pH en línea a 4.5 utilizando un 2% de tampón de acetato de sodio 1 M, pH 4.5. La proteína se eluye con fosfato de sodio 60 mM, pH 5.8 que contiene caprilato de sodio 10 mM. Las fracciones de las diferentes etapas del método, que incluyen flujo pasante, lavado 1, lavado 2, elución y regeneración, se cargan en el gel.

La FIG.3 ilustra la separación de agregados y productos de degradación en PPG, una resina HIC. Se inyectan 50 microlitros de las muestras de flujo pasante y regeneración en la columna BipSep™ s2000 para la cromatografía de exclusión por tamaño. Los resultados mostraron la presencia de albúmina sérica humana monomérica en el flujo pasante, mientras que la fracción de regeneración contiene principalmente agregados y producto de degradación.

La FIG.4 ilustra las diferentes fracciones obtenidas en el fraccionamiento de albúmina sérica humana en PPG cargado en 10% de gel de SDS-PAGE. El panel izquierdo ilustra los resultados de la cromatografía sin la adición de caprilato y cisteína a la carga, mientras que el panel de la derecha muestra los resultados de la adición de caprilato y cisteína a la carga. La adición de caprilato y cisteína da como resultado un aumento de la cantidad de monómero en el flujo pasante y en el lavado del 60-70% (sin aditivos) al 87-97%. Este método permite la separación de hasta 30% de agregados y 30% de productos de degradación en una sola etapa.

La FIG. 5 ilustra la SDS PAGE del producto purificado final después de la cromatografía de intercambio aniónico. Se cargaron 20 microgramos de la proteína en 10 % de SDS-PAGE y se sometieron a tinción con azul de coomassie. Los resultados muestran la pureza de la albúmina sérica humana recombinante.

La FIG. 6 ilustra la masa intacta de la albúmina sérica humana recombinante final. La masa intacta de la albúmina sérica humana recombinante es de 66.483 kDa y es idéntica a la de la HSA estándar.

La FIG. 7 ilustra la PAGE nativa, la SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras y la transferencia Western e hibridación con anticuerpos de albúmina anti-humana de albúmina recombinante en comparación con albúmina estándar. Los resultados muestran identidad entre la albúmina sérica humana recombinante purificada en la presente invención con la albúmina estándar.

La FIG. 8 ilustra los resultados de la comparación de diferentes tipos de espectros de albúmina sérica humana recombinante con albúmina estándar. La albúmina sérica humana recombinante purificada se compara con la albúmina estándar mediante espectroscopía UV, fluorescencia y CD. Los resultados de estos espectros mostraron similitud de la albúmina sérica humana recombinante con la albúmina estándar.

La FIG. 9 ilustra los perfiles de HPLC de albúmina estándar y recombinante. La albúmina sérica humana recombinante purificada se somete a SEC HPLC y RP HPLC. La SEC HPLC mostró un alto porcentaje de pureza de proteína con menos del 1% de agregados. La RP HPLC mostró una pureza del 100% del suero humano recombinante.

La proteína recombinante así obtenida en las etapas anteriores se caracteriza por espectrometría de masas, que mostró una pureza del 100%. La secuenciación N terminal de la albúmina sérica humana recombinante purificada mostró identidad con la albúmina de plasma. El coeficiente de tiol de la albúmina recombinante purificada mediante el método anterior mostró que más del 75% de las moléculas tienen un grupo tiol libre en comparación con un máximo del 30% en albúmina plasmática. Dado que el tiol libre es muy importante en la función de la albúmina como molécula transportadora, la albúmina recombinante proporciona una ventaja significativa sobre la albúmina plasmática debido a un mayor porcentaje de las moléculas que comprenden el grupo tiol libre.

Según el método de la presente invención, el coeficiente de tiol libre de albúmina es mayor de 0,7 en HIC en modo de flujo pasante.

La albúmina sérica humana recombinante muestra glicación similar, impurezas de bajo peso molecular, características de unión a bilirrubina, warfarina y ácido graso como albúmina estándar.

Para que esta invención se entienda más completamente, se exponen los siguientes ejemplos preparativos y de prueba. Estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

#### Ejemplo 1: Clarificación

- a. La primera etapa de la purificación de la proteína es la separación celular. El caldo de fermentación se diluye con un volumen igual de agua y se somete a centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos. Esta etapa da como resultado la recuperación de más del 90% de la proteína.
- b. El sobrenadante libre de células aislado en la etapa anterior se somete a microfiltración con filtros de poro de 0.1-0.45 micras. > 90% de la proteína se recupera con el filtrado completamente libre de células, restos celulares y partículas.

## Ejemplo 2: Diafiltración

5 El caldo microfiltrado del ejemplo 1 se somete a diafiltración. El filtrado se concentra a 20 mg/ml y se diafiltra contra agua utilizando filtros de fibra hueca de 30 kDa hasta que la conductividad es <2mS/cm. La muestra diafiltrada se utiliza para cromatografía de columna. La recuperación en esta etapa es superior al 90%.

10 Se puede introducir una etapa opcional de tratamiento térmico después de la microfiltración, en donde se añaden caprilato de sodio 5-20 mM y cisteína 5-20 mM al caldo y las muestras se calientan a una temperatura de 60°C durante 60-120 minutos. Esta etapa es efectiva en la desnaturalización de las proteasas ácidas, si las hay, que de otro modo causarían la degradación de la proteína. Sin embargo, esta etapa es solo opcional y no es esencial para lograr la purificación de la albúmina recombinante.

## Ejemplo 3: Cromatografía de intercambio catiónico

15 La SP Sepharose FF, una resina de intercambio catiónico que es barata y tiene una larga vida útil: la resina se ha sometido a ensayo durante 300 ciclos y se carga a una altura de lecho de 15 cm. Se equilibra con tampón de acetato de sodio 50mM, pH 4.5. La muestra diafiltrada a pH neutro se diluye con agua a 10 mg/ml. La proteína se carga en la columna con un ajuste de pH en línea a 4.5 utilizando 2% de acetato de sodio 1M, pH 4.5. El tiempo de residencia de la proteína se incrementa gradualmente para obtener la máxima unión de la albúmina a la resina. La carga se realiza como se muestra en la FIG. 10.

20 En las condiciones anteriores, se cargan 230mg de albúmina por ml de resina. El flujo pasante o lavado equilibrante no tiene ningún rastro de albúmina. Se reivindica que SP Sepharose FF de GE exhibe una capacidad de unión de 130mg/ml para BSA con una penetración del 10%, permitiendo este método de unión un 75% más de unión a la resina, reduciendo así el coste por gramo del producto final.

Además, las muestras que se tratan térmicamente después de la diafiltración se diluyen a 5mg/ml con agua y se cargan en la columna con un ajuste de pH en línea de 4.5 como se muestra en la FIG. 11.

25 En las condiciones anteriores, se cargan hasta 140mg de albúmina por ml de resina sin ninguna penetración. La unión también se ha realizado en donde la albúmina se ha unido hasta a 80mg/ml de resina a los 5 minutos de tiempo de residencia, seguido de la carga de hasta 140mg/ml a los 15 minutos de tiempo de residencia. 140mg de albúmina/ml de resina se une con éxito en estas condiciones sin trazas de albúmina en el flujo pasante.

El método seguido después de la carga se resume en la FIG. 12.

30 Después de cargar, la columna se lava con tampón equilibrante, seguido de lavado con 3CV de acetato de sodio 25mM, pH 4.5 que contiene sulfato de amonio 50mM y 2% de Tween 20. Esta etapa de lavado elimina el pigmento, la proteína de la célula huésped y ciertos productos de degradación de albúmina. A continuación, se lava con 2-3 CV de acetato de sodio 25mM, pH 4.5, seguido de 3 CV de acetato de sodio 25mM, pH 4.5 que contiene urea 2M. Esta etapa de lavado elimina el pigmento de manera muy efectiva. La urea se elimina de la columna lavando con 3CV de acetato de sodio 25 mM, pH 4.5.

35 La proteína se eluye con tampón fosfato de sodio 60mM, pH 5.8 con caprilato de sodio 10mM. La proteína recuperada en esta etapa es superior al 90%.

40 Se pueden utilizar también otras resinas de intercambio catiónico en lugar de la SP Sepharose FF utilizada en este ejemplo. Los intercambiadores de cationes con reivindicaciones de capacidades de unión superiores podrán, utilizando el método de carga anterior, ser capaces de proporcionar una capacidad de unión de albúmina del 75% a dos veces mayor en comparación con la reivindicación del fabricante.

La adición de caprilato mejora la recuperación de la proteína y reduce la agregación. Se observa una reducción constante del pigmento al final de la cromatografía de intercambio de cationes como se tabula en la FIG. 13.

## Ejemplo 4: Cromatografía de interacción hidrofóbica

45 La proteína purificada por el Ejemplo 3 comprende albúmina, sus agregados y su producto de degradación de 45kDa. La proteína se somete a cromatografía de interacción hidrofoba en modo de flujo pasante utilizando PPG como la resina de elección.

Al eluyente de la etapa anterior, se añade sulfato de amonio a una concentración final de 1.2M. La cisteína se añade a una concentración final de 10mM. El pH se ajusta a 7.0 y la concentración de caprilato se reajusta a 10mM con la adición adicional del volumen deseado de caprilato de sodio 1M. La muestra preparada se carga en la columna HIC.

50 La resina PPG se carga a una altura de lecho de 15cm y se equilibra con tampón fosfato 25mM, pH 7.0 con sulfato de amonio 1.2M, cisteína 10mM y caprilato 10mM. La muestra preparada anteriormente se carga en la columna en un tiempo de residencia de 15 minutos. La albúmina monomérica no se une en las condiciones anteriores, mientras que el producto de degradación de 45kDa y los agregados de albúmina se unen a la columna. La resina tiene una capacidad de unión de 15mg/ml. Por lo tanto, se cargan hasta 150 mg de albúmina/ml de resina en la columna cuando

la suma de los agregados y los productos de degradación de la albúmina son <10% de la albúmina total. Si el porcentaje de agregados y productos de degradación de la albúmina supera el 10%, la cantidad de albúmina a cargar se ajusta en consecuencia.

- 5 La mayor parte de la albúmina monomérica fluye fuera de la columna. Un lavado con 3-5 CV de tampón de equilibrado elimina el resto de la albúmina monomérica, que se une libremente a la resina. Los agregados y productos de degradación se eluyen con agua.

10 El flujo pasante y el lavado se juntan. La recuperación en esta etapa es del 87-97%. La adición de caprilato da como resultado una recuperación de monómero > 87%, mientras que en su ausencia la recuperación alcanzada es <70%. La cisteína ayuda a mantener el tiol único "libre" y reduce el pigmento en el producto final.

Los agregados al final de esta etapa son <2.5%, el tiol libre >70% y A350/A280 = 0.03-0.035. No se observan trazas de productos de degradación en la acumulación final.

#### Ejemplo 5: Diafiltración

- 15 El flujo pasante y el lavado obtenido se concentra a > 50 mg/ml y se diafiltra contra agua hasta que la conductividad es <2-3 mS/cm. La recuperación en esta etapa es del 95-98%.

#### Ejemplo 7: Cromatografía de intercambio aniónico

- 20 La resina de intercambio aniónico (DEAE Sepharose Fast Flow o cualquier otra resina de intercambio aniónico) se carga a una altura del lecho de 15 cm y se equilibra con tampón fosfato 20 mM, pH 7.0. La proteína obtenida en el Ejemplo 5 se diluye a 5 mg/ml con agua y se carga en resina de intercambio aniónico. La columna se lava con 5 CV de tampón equilibrante seguido de elución con acetato de sodio 50 mM, pH 4.5. Esta etapa da como resultado la recuperación del 98-100% de proteína.

Los agregados al final de esta etapa son < 2.5%, tiol libre 0.75-0.80. El pigmento se reduce a A350/A280=0.025-0.015.

#### Ejemplo 8: Concentración de la proteína

- 25 La proteína eluida del Ejemplo 7 se ajusta a pH 7.0 con hidróxido de sodio. La proteína se concentra a 200 mg/ml y se diafiltra contra agua. El tampón de fosfato, pH 7.0, cloruro de sodio y caprilato de sodio se añaden a una concentración final de tampón de fosfato de sodio 20mM, pH 7.0, cloruro de sodio 144 mM y capilato de sodio 8 mM, respectivamente. La proteína se filtra a través de filtros de 2 micras en las botellas de almacenamiento. La proteína embotellada se somete a pasteurización a una temperatura de 60°C durante 10 horas. El producto final tiene las características que se muestran en la FIG.14.

- 30 Las características fisicoquímicas de la albúmina son idénticas a la albúmina estándar determinada por espectrofotometría de masas, secuenciación N terminal, secuenciación C terminal, IEF, 2 D IEF, espectros UV, de fluorescencia y CD y características de unión para bilirrubina, warfarina y ácidos grasos.

- 35 La proteína purificada mediante el método de la presente invención da como resultado una alta pureza de la albúmina sérica humana recombinante. Todo el método de purificación se completa en dos días desde el cultivo hasta la obtención del producto final. Esto hace que el método sea comercialmente exitoso y viable. Por lo tanto, el método es rentable.



**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la purificación de la albúmina humana recombinante, comprendiendo el método (100) las etapas de:
- 5 a. separar la pluralidad de células del caldo de fermentación o el cultivo mediante centrifugación (101);
  - b. microfiltrar el sobrenadante libre de células obtenido (102);
  - c. concentrar el sobrenadante microfiltrado y diafiltrarlo contra agua (103);
  - d. cargar la muestra diafiltrada en una columna de intercambio catiónico para purificación en modo de unión y elución (104);
  - 10 e. separar la albúmina monomérica de los agregados y productos de degradación mediante cromatografía de interacción hidrofóbica mediante la adición de cisteína 5-30mM y caprilato 5-30mM en modo de flujo pasante (105);
  - f. acumular el flujo pasante y el lavado y diafiltrarlo contra agua (106);
  - g. cargar la albúmina en resina de intercambio aniónico para cromatografía en modo de unión y elución (107);
  - 15 h. concentrar la proteína eluida y diafiltrar contra agua (108); y
  - i. filtrar la proteína estéril y someterla a pasteurización a una temperatura de 60°C durante 1-10 horas (109).
2. El método la reivindicación 1, en donde el caldo de fermentación se selecciona del grupo que consiste en bacterias, hongos, células de mamífero u homogeneizado de plantas transgénicas que producen albúmina humana recombinante.
- 20 3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicha carga de muestra diafiltrada en la resina de intercambio catiónico se realiza mediante un aumento gradual en el tiempo de residencia, lo que permite aumentar la capacidad de carga en un 75-150% por encima de la capacidad de unión marcada de la resina.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde hay un aumento en la recuperación de proteína de albúmina en la acumulación de flujo pasante y lavado a >87% en HIC en modo de flujo pasante.
- 25 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde hay una proporción de tiol libre de albúmina de más de 0.7 en HIC en modo de flujo pasante.

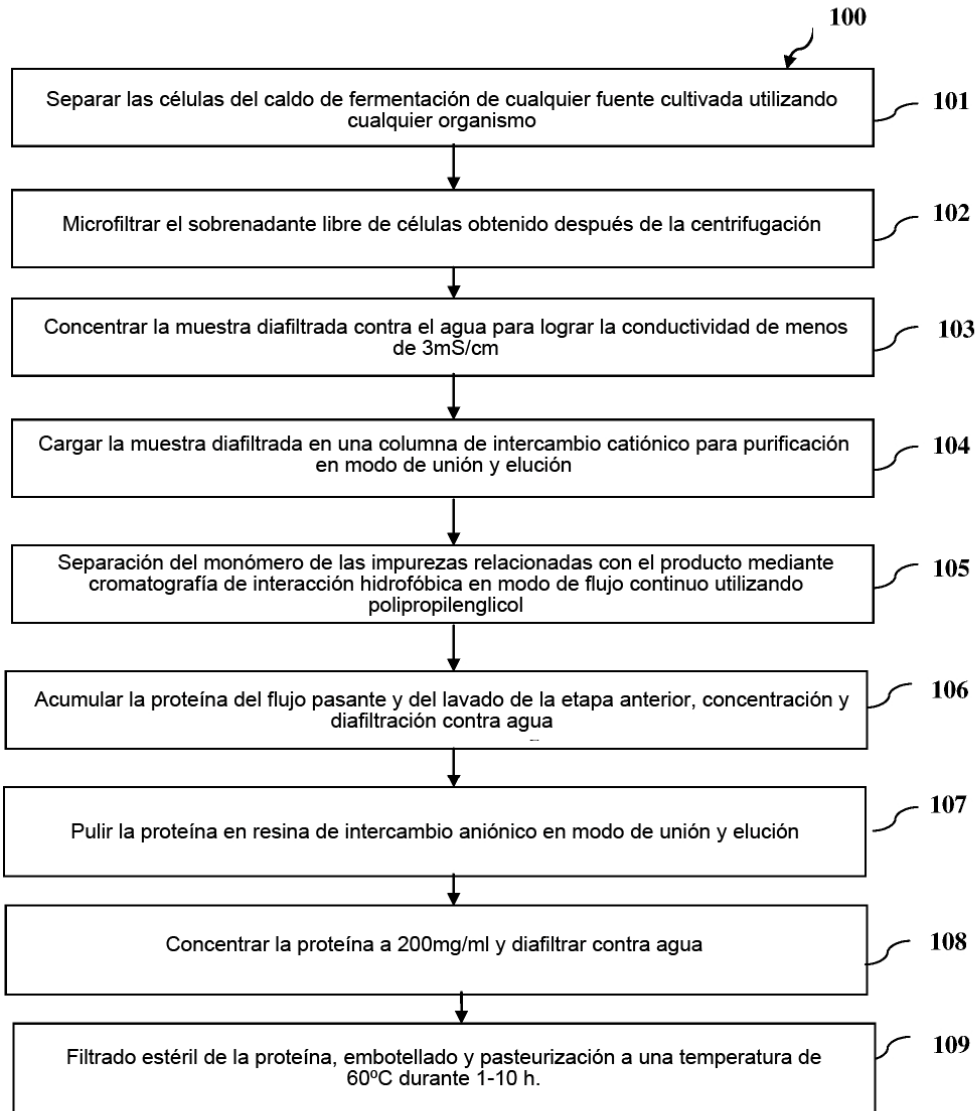


FIGURA 1

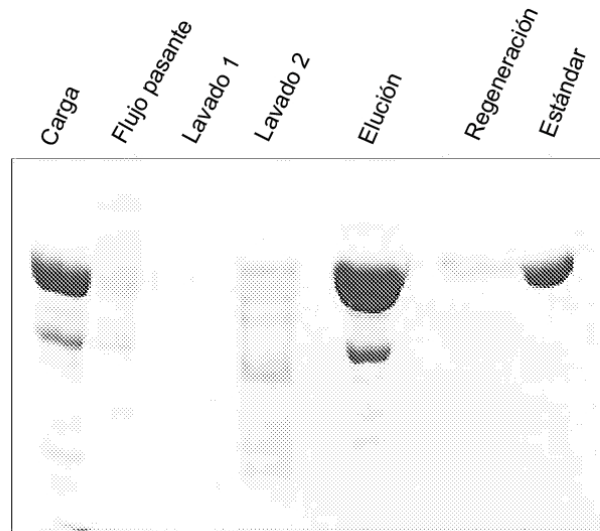


FIGURA 2

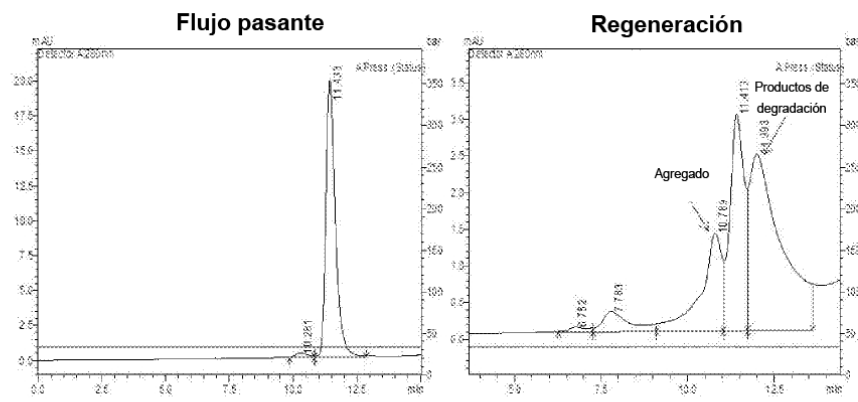


FIGURA 3

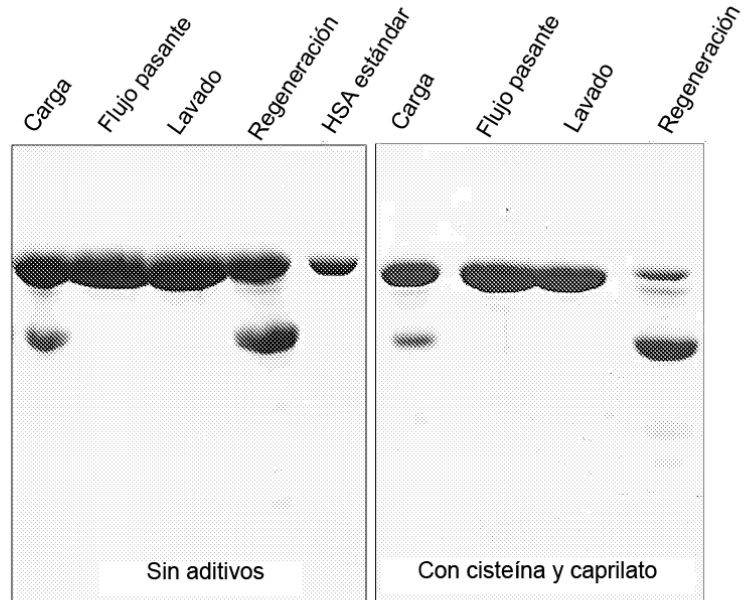


FIGURA 4

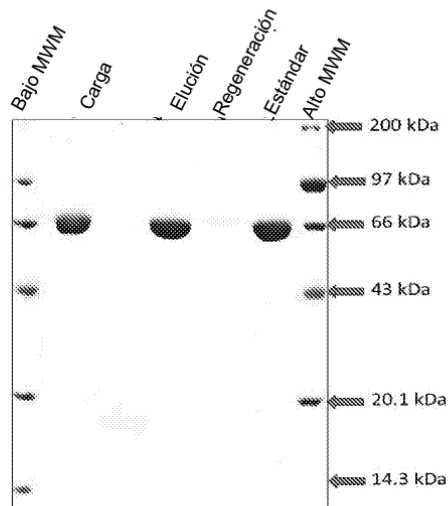


FIGURA 5

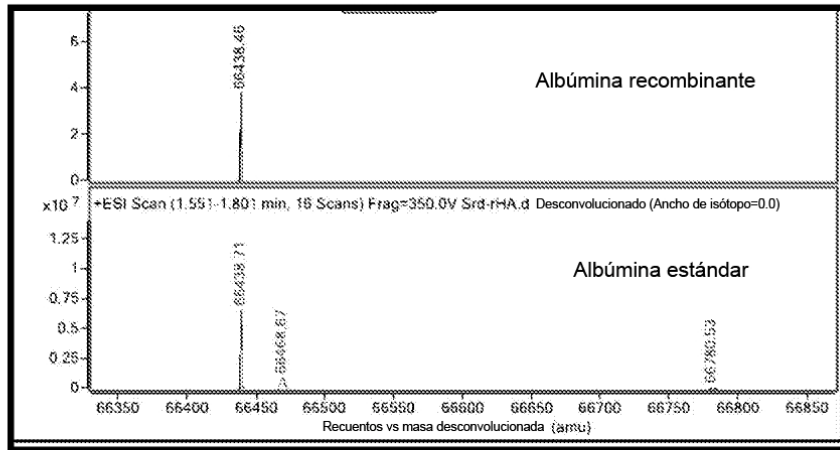


FIGURA 6

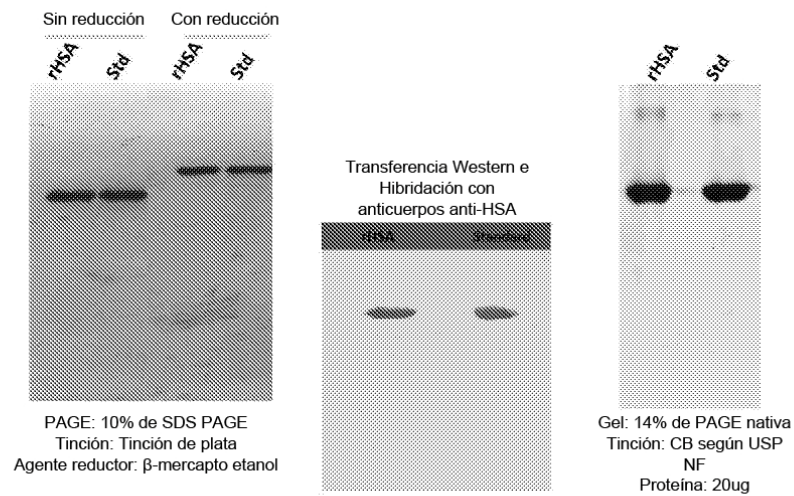


FIGURA 7

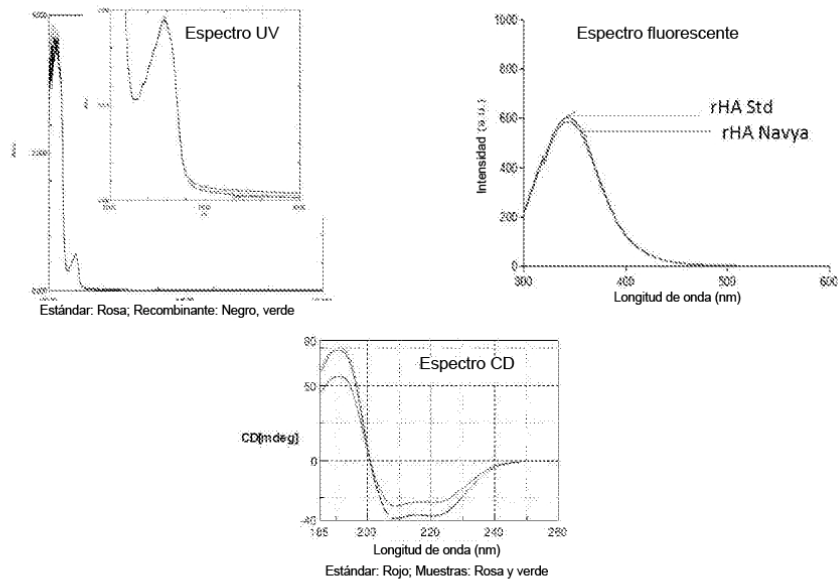


FIGURA 8

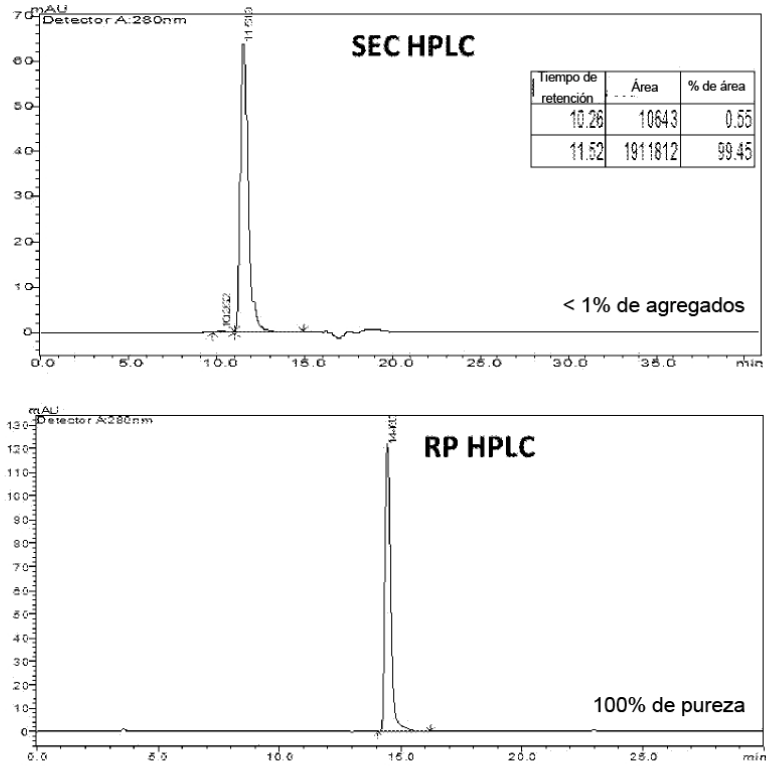


FIGURA 9

Cantidad cargada (Albúmina/ml de resina)	Tiempo de residencia (en min)
0-80 mg	5
80-100 mg	7
100-120 mg	9
120-230 mg	15

FIGURA 10

Cantidad cargada (Albúmina/ml de resina)	Tiempo de residencia (en min)
0-80 mg	5
80-100 mg	7
100-120 mg	9
120-140 mg	15

FIGURA 11



ES 2 780 367 T3

Método	Tampón utilizado	Volúmenes de columna
Equilibrante	Acetato de sodio 50mM pH 4.5	5
Carga	Muestra de rHSA + 2% de acetato de sodio 1M pH 4.5	
Lavado 1	Acetato de sodio 50mM pH 4.5	3
Lavado 2	Acetato de sodio 25mM pH 4.5 + sulfato de amonio 50mM + 2% de tween 20	3
Lavado 3	Acetato de sodio 25mM pH 4.5	3
Lavado 4	Acetato de sodio 25mM pH 4.5 + Urea 2M	3
Lavado 5	Acetato de sodio 25mM pH 4.5	3
Elución	P.B. 60mM pH 5.8 + Caprilato 10mM	6

FIGURA 12

# ES 2 780 367 T3

	A350/A280
Carga	0.12
Elución	0.06

FIGURA 13

HCP	< 100 ppb
HCD	No detectado
Coefficiente de tiol	0.75-0.8
Glicación	< 0.3%
Pigmento	(A350/A280): 0.02-0.015
Agregados	<3%
Producto de degradación	<2%

FIGURA 14