(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 323 642**

(51) Int. Cl.:
C07K 1/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04755271 .6**
(96) Fecha de presentación : **15.06.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1638990**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **29.03.2006**

(54) Título: **Retirada de lipopolisacáridos de complejos de proteína-lipopolisacárido mediante disolventes no inflamables.**

(30) Prioridad: **24.06.2003 US 480899 P**
18.07.2003 US 488596 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.07.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.07.2009

(73) Titular/es: **N.V. Organon**
Kloosterstraat 6
5349 AB Oss, NL

(72) Inventor/es: **Ropp, Philip, Alfred y**
Murray, Michael, Van, Alen

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 323 642 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

Retirada de lipopolisacáridos de complejos de proteína-lipopolisacárido mediante disolventes no inflamables.

Campo de la invención

Las realizaciones de la presente invención se refieren generalmente a la retirada de lipopolisacáridos (LPS) de complejos de proteína-lipopolisacárido.

Antecedentes de la invención

El lipopolisacárido (LPS) es un componente principal de la membrana externa de bacterias gram negativas. El componente endotóxico de LPS es la porción de lípido A. Comprende restos de D-glucosamina unidos en 1,6 que están sustituidos con hasta seis cadenas de acilo y una estructura de polisacárido central a la que se pueden unir unidades adicionales de repetición de polisacárido. La endotoxina es un potente activador del sistema inmune innato a bajas dosis mientras que a dosis mayores, la endotoxina induce varias reacciones físicas diferentes que incluyen choque séptico y muerte (Heine *et al*, 2001). Por lo tanto, la contaminación de productos terapéuticos con endotoxinas es una preocupación principal para los fabricantes de tales productos.

Se producen muchas proteínas recombinantes en la bacteria gram negativa *Escherichia coli*. La retirada de LPS de estas proteínas recombinantes puede ser un proceso complicado pero esencial, especialmente si las proteínas tienen por objeto usos terapéuticos. Se han desarrollado muchos procesos diferentes para la retirada de LPS de proteínas basándose en las propiedades moleculares únicas de las moléculas de endotoxina. Estos incluyen resinas de afinidad por LPS, extracciones en dos fases, ultrafiltración, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico y adsorbedores de membrana (revisado por Petsch y Anspach, 2000). Estos procedimientos tienen grados variables de éxito en la separación de LPS de proteínas, que, en gran medida, depende de las propiedades de la proteína de interés.

Frecuentemente, durante la producción de proteínas recombinantes, se presentan dificultades en la separación de LPS de proteínas debidas a interacciones de proteína-LPS. Por ejemplo, y no a modo de limitación, en proteínas recombinantes producidas por un sistema de expresión de *E. coli*. Se han investigado varios de los procedimientos publicados para la separación de LPS de proteínas, que incluyen, pero sin limitación necesaria, cromatografía de interacción hidrófoba desnaturalizante (Wilson *et al*, 2001) y el uso de lavados con etanol, isopropanol (Franken, *et al*, 2000) o detergente (Fiske, *et al*, 2001) mientras que la proteína estaba inmovilizada sobre medio cromatográfico de intercambio iónico.

Algunos experimentos han mostrado que los lavados con alcohol y detergente durante la cromatografía de intercambio iónico son eficaces disminuyendo los niveles de LPS asociados a proteínas, aunque se consiguió una mala separación de LPS de las proteínas mediante el procedimiento de HIC desnaturalizante. Se demostró que los detergentes (Zwittergent 3-12 ó 3-14) eran agentes de lavado más eficaces que los alcoholes. También se consiguió un aclaramiento de LPS mejorado mientras que los complejos de LPS-proteína se unieron a una resina de intercambio catiónico en oposición a una resina de intercambio aniónico, pero los procedimientos de lavado usados para retirar LPS fueron eficaces en ambas matrices. Cuando el procedimiento de lavado se realiza en un intercambiador catiónico, una vez que las interacciones de LPS-proteína se han interrumpido, el LPS se debe eliminar por lavado de la columna mientras que se retiene la proteína. Durante la cromatografía de intercambio aniónico, el LPS, estando cargado negativamente a la mayoría de los pH, permanece unido a la resina junto con la proteína. Incluso aunque los lavados con alcohol y detergente fueron exitosos reduciendo los niveles de LPS en los complejos de LPS-proteína, el cambio de escala y la implementación de cualquiera de estos procedimientos en un entorno de fabricación no serían prácticos. Las concentraciones de etanol e isopropanol requeridas para reducir eficazmente los niveles de LPS de las proteínas de unión a LPS fueron mayores del 50% (V/V). A estas concentraciones, estas soluciones se consideran líquidos inflamables y, como tales, imponen muchas restricciones de seguridad y funcionales.

Los detergentes, incluso aunque son muy eficaces reduciendo los niveles de LPS, son relativamente caros y añadirían costes significativos a un proceso de fabricación y pueden afectar a la bioactividad de la proteína de interés. En consecuencia, se desean agentes químicos alternativos que se podrían usar de forma segura y económica en lugar de los alcoholes o detergentes como agentes de lavado para la separación de LPS de proteínas durante operaciones con unidades cromatográficas. De forma ideal, estos agentes químicos serían relativamente económicos, estarían bien definidos químicamente, presentarían aspectos de seguridad mínimos y tendrían un impacto mínimo sobre la bioactividad de la proteína en cuestión cuando se implementan en un proceso.

Sumario de la invención

Las realizaciones de la presente invención se refieren generalmente a la capacidad de los alcanodioles de separar lipopolisacáridos (LPS) u otras endotoxinas de proteínas. En una realización, los alcanodioles son capaces de realizar la separación de LPS de complejos de LPS-proteína. En consecuencia, las realizaciones de la presente invención se refieren generalmente a procesos que usan alcanodioles para realizar la separación de LPS de complejos de LPS-proteína. En realizaciones adicionales, los complejos están inmovilizados sobre una resina y el LPS se separa de la misma.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1a es una ilustración del Perfil de Elución en SP Sepharose Fast Flow de BODIPY-LPS. La línea de puntos es la señal de UV a 280 nm y la línea continua se corresponde en la fluorescencia de BODIPY expresada en unidades relativas de fluorescencia (URF).

La Figura 1b es una ilustración del Perfil de Elución en SP Sepharose Fast Flow del Complejo BODIPY-LPS-Transferrina. La línea de puntos es la señal de UV a 280 nm y la línea continua se corresponde a la fluorescencia de BODIPY expresada en unidades relativas de fluorescencia (URF).

La Figura 2 es una ilustración de los Perfiles de Elución de BODIPY-LPS de Complejos de BODIPY-LPS-Transferrina en SP Sepharose Fast Flow Junto con Lavados con Alcanodiol. Se generaron complejos de BODIPY-LPS-transferrina, se cargaron en una columna de SP Sepharose Fast Flow y la columna se lavó con soluciones a 50% de 1,4-butanodiol, 1,6-hexanodiol o 1,2-hexanodiol.

La Figura 3 es una ilustración de la reducción de BODIPY-LPS de Complejos de BODIPY-LPS-Transferrina en Eluatos de SP Sepharose Fast Flow por Alcanodioles. La reducción del cero por ciento se corresponde a un proceso de control sin un lavado con alcanodiol. 1, 1,2-hexanodiol; 2, Zwittergent 3-14 al 1%; 3, 1,6-hexanodiol; 4, etilenglicol; y 5, 1,4-butanodiol.

La Figura 4 es una ilustración de la reducción de BODIPY-LPS de complejos de BODIPY-LPS-BSA en eluatos de SP Sepharose Fast Flow por Alcanodioles. La reducción del cero por ciento se corresponde a un proceso de control sin un lavado con alcanodiol. 1, 1,2-hexanodiol; 2, Zwittergent 3-14 al 1%; 3, 1,2-butanodiol; 4, 1,6-hexanodiol; 5, isopropanol al 50%; 6, etanol al 75%; 7, 1,4-butanodiol; y 8, etilenglicol.

La Figura 5 es una ilustración de las viscosidades de Alcanodiol, Isopropanol, Etanol y Soluciones de Zwittergent en Acetato 100 mM, pH 4,5. Todas las soluciones se prepararon con tampón Acetato 100 mM, pH 4,5. 1, 1,6-hexanodiol al 50%; 2, 1,2-hexanodiol al 50%; 3, 1,4-butanodiol al 50%; 4, 1,2-butanodiol al 50%; 5, Etilenglicol al 50%; 6, Isopropanol al 50%; 7, Etanol al 75%; 8, Zw 3-14 al 1%; y 9, Acetato 100 mM, pH 4,5.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en este documento, el término “alcanodiol” significa y se refiere a un hidrocarburo saturado no aromático con la fórmula general $C_nH_{2n}(OH)_2$.

Como se usan en este documento, las expresiones complejo de proteína-LPS y complejo de LPS-proteína deben ser sinónimos. El complejo de proteína-LPS puede ser una asociación o unión débil, tal como, por ejemplo y no a modo de limitación, mediante fuerzas intramoleculares/fuerzas intermoleculares.

Generalmente, las realizaciones de la presente invención se refieren a procesos para separar lipopolisacáridos o endotoxinas de complejos de proteína-lipopolisacárido (u otra sustancia que comprende endotoxina). En una realización, un proceso para separar lipopolisacáridos de complejos de proteína-lipopolisacárido comprende la etapa de lavar un complejo de proteína-LPS con una solución que contiene alcanodiol por lo que al menos una porción del LPS se retira y/o se separa de la proteína.

En una realización, el complejo de LPS-proteína (u otro complejo de endotoxina) se produce y/o forma durante la producción de proteínas, tales como, pero sin limitación, proteínas recombinantes.

Las realizaciones de la presente invención pueden usar cualquier proteína. Diversos ejemplos incluyen, pero sin limitación, albúmina Bovina (BSA), holo-transferrina bovina, lactoferrina de leche bovina, lisozima de claras de huevo de pollo, proteínas de choque térmico, proteínas de fusión de choque térmico y similares. Las diversas proteínas pueden ser simples o complejas, pequeñas o grandes.

Se pueden usar diversos procesos y/o sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes. Se puede usar cualquier sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes. En una realización, el sistema de expresión es bacteriano. En tales realizaciones, se pueden usar sistemas de expresión bacterianos gram negativos tales como un sistema de expresión en *E. coli*. Sin embargo, también se pueden usar otros tipos de sistemas bacterianos, por ejemplo, y no a modo de limitación, *Caulobacter crescent* y *Proteus mirabilis.*

En general, cualquier sistema que comprende endotoxina o endotoxinas puede usar realizaciones de la presente invención para separar la endotoxina de la proteína. Por ejemplo, en una realización, la endotoxina o las endotoxinas son una impureza en un sistema que comprende proteínas. Se conoce bien en la técnica que la endotoxina o las endotoxinas, en algunos casos, se pueden encontrar como contaminantes en materiales sin procesar o durante el procesamiento. Tales endotoxinas se pueden retirar y/o separar mediante diversas realizaciones de la presente invención.

Se puede usar cualquier alcanodiol con diversas realizaciones de la presente invención. Los ejemplos adecuados, no limitantes, incluyen 1,5-pentanodiol, 1,6-hexanodiol, 1,2-hexanodiol, 1,2-butanodiol, 1,4-butanodiol y 1,7-

heptanodiol. En una realización, los alcanodioles de la presente invención son alcanodioles de cadena larga. Los alcanodioles proporcionan seguridad aumentada con respecto a los eluyentes usados comúnmente, como acetonitrilo, etanol y metanol, ya que los alcanodioles son todos compuestos no inflamables. Adicionalmente, los alcanodioles son solubles en agua y no son prohibitivos en cuanto a costes para un gran número de procesos.

En otras realizaciones se utilizan diversos procesos para ayudar a y/o facilitar la separación del complejo de proteína-LPS. En diversos ejemplos de estas realizaciones, el complejo de proteína-LPS está unido a un sustrato. Diversos métodos de unión incluyen la retención, atracción, unión, aplicación, inmovilización y/o fijación de forma amovible a un sustrato. Se puede unir la proteína o el LPS. En una realización, el complejo de LPS-proteína está unido o inmovilizado sobre una resina. Los tipos de resina adecuados incluyen, pero sin limitación, resinas de afinidad, resinas de intercambio aniónico, resinas de intercambio catiónico y similares, tal como una resina SP Sepharose Fast Flow (resina SPSFF). Sin embargo, la selección de resinas es un aspecto rutinario en la técnica y se puede realizar para servir a las necesidades particulares del proceso.

En una realización, el complejo de LPS-proteína está unido a una resina de intercambio iónico en condiciones tales que la proteína se une a la resina de la columna. Después se aplica a una solución de lavado con alcanodiol a la columna, por lo que al menos una porción del LPS se separa del complejo de LPS-proteína y eluye con o próximo al alcanodiol. En una realización se separa más del 50% del LPS del complejo de LPS-proteína. En una realización alternativa se separa más del 75% del LPS del complejo de LPS-proteína. En otra realización se separa más del 80% del LPS del complejo de LPS-proteína. En otra realización se separa más del 85% del LPS del complejo de LPS-proteína. En una realización alternativa se separa más del 90% del LPS del complejo de LPS-proteína. En otra realización más se separa más del 95% del LPS del complejo de LPS-proteína. En otra realización se separa más del 97% del LPS del complejo de LPS-proteína. En otra realización se separa más del 99% del LPS del complejo de LPS-proteína. En otra realización se separa más del 99,9% del LPS del complejo de LPS-proteína.

En una realización, después de la separación y/o la retirada del LPS, la proteína se puede eluir de la resina. La proteína se puede eluir mediante medios comunes en la técnica y como sea apropiado para la resina. En un ejemplo, para intercambiadores iónicos se pueden usar cambios en pH y/o conductividad aumentada para eluir la proteína.

En una realización, el 50% de la proteína eluída de la resina carece de LPS u otra endotoxina. En una realización alternativa, el 75% de la proteína eluída de la resina carece de LPS u otra endotoxina. En una realización alternativa, el 80% de la proteína eluída de la resina carece de LPS u otra endotoxina. En una realización alternativa, el 85% de la proteína eluída de la resina carece de LPS u otra endotoxina. En una realización alternativa, el 90% de la proteína eluída de la resina carece de LPS u otra endotoxina. En una realización alternativa, el 95% de la proteína eluída de la resina carece de LPS u otra endotoxina. En una realización alternativa, el 97% de la proteína eluída de la resina carece de LPS u otra endotoxina. En una realización alternativa, el 99% de la proteína eluída de la resina carece de LPS u otra endotoxina. En una realización alternativa, el 99,9% de la proteína eluída de la resina carece de LPS u otra endotoxina.

En diversas realizaciones se utiliza otro lavado para retirar/separar la proteína de la resina. En una realización alternativa, la proteína eluye sin ningún lavado, de tal forma que la resina solamente ha ralentizado la elución de proteína, separando de este modo el LPS de la proteína. El grado de separación se puede variar dependiendo de la resina usada. Asimismo, se puede construir una resina para cambiar el perfil de elución del complejo de LPS-proteína de tal forma que el componente de LPS o de proteína eluye en un momento diferente que el otro componente.

En consecuencia, diversas realizaciones de la presente invención comprenden procesos tales como:

Un proceso para retirar una endotoxina de proteínas producidas de forma recombinante que comprenden un complejo de Lipopolisacárido (LPS)-proteína que comprende las etapas de:

inmovilizar el complejo en una resina de intercambio iónico;

lavar la resina con un alcanodiol por lo que al menos la porción del LPS se separa del complejo; y

eluir al menos una porción de la proteína de la resina.

En realizaciones alternativas, el LPS se fija a la resina y en primer lugar eluye la proteína.

En realizaciones adicionales, la presente invención comprende un proceso para alterar un complejo de lipopolisacárido (LPS)-proteína que comprende lavar el complejo con un alcanodiol.

En otras realizaciones adicionales, la presente invención comprende procesos para aumentar el tiempo de retención de una proteína en una resina que comprende la etapa de lavar la resina con un alcanodiol. En un ejemplo de una realización de este tipo, después de un lavado con un hexanodiol, tal como 1,2-hexanodiol, para retirar el LPS, el aumento de la concentración de sales en la resina no consigue eluir la proteína. Tales realizaciones son útiles para entornos altamente salinos y donde se desea alterar la selectividad de la resina por proteínas.

En consecuencia, las realizaciones de la presente invención comprenden adicionalmente métodos para separar LPS de un complejo de proteína-LPS en un entorno altamente salino, de conductividad, que comprende las etapas de:

inmovilizar el complejo a una resina de intercambio iónico;

lavar la resina con 1,2-hexanodiol por lo que al menos una porción del LPS se separa del complejo; y

eluir al menos una porción de la proteína de la resina modificando el pH.

En realizaciones preferidas de este tipo, la concentración de alcanodiol es mayor de aproximadamente el 5%. Sin embargo, se puede usar cualquier concentración.

Aunque la invención se ha descrito en relación a realizaciones específicas de la misma, se entenderá que es susceptible a modificaciones adicionales y que las Reivindicaciones adjuntas tienen por objeto abarcar cualquier variación, uso o adaptación de la invención, siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo tales separaciones de la presente descripción que entran dentro de la práctica conocida o habitual en la técnica a la que pertenece la invención y como se puede aplicar a los elementos esenciales que se han indicado anteriormente en este documento que existen ahora o que surjan después. Además, aunque las realizaciones de la invención se han descrito con características dimensionales y/o mediciones específicas, se entenderá que las realizaciones son susceptibles a características dimensionales y/o mediciones diferentes sin apartarse de los principios de la invención y las Reivindicaciones adjuntas tienen por objeto abarcar tales diferencias. Adicionalmente, todas las patentes mencionadas en este documento se incorporan en este documento como referencia.

Para una comprensión adicional de diversas realizaciones de la presente invención, se debe hacer referencia a los siguientes ejemplos:

Ejemplos y experimentos

Materiales

Se adquirieron albúmina bovina (BSA), holo-transferrina bovina, lactoferrina de leche bovina, lisozima de claras de huevo de pollo, lipopolisacáridos de *Escherichia coli* serotipo O55:B5 y BSTFA en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Se adquirieron ácido acético, Tris (base), hidróxido sódico (NaOH), ácido clorhídrico, cloruro sódico (NaCl), etanol, isopropanol, dodecilsulfato sódico (SDS) y fosfato sódico dibásico 7-hidrato en J. T. Baker Chemical Co. (Phillipsburg, NJ). El 1,6-Hexanediol era de BASF Co. (Mount Olive, NJ). Se adquirieron 1,2-Hexanodiol, 1, 2-butanodiol y Zwittergent 3-14 (Zw 3-14) en Fluka (Milwaukee, WI). Se adquirieron 1,4-Butanodiol y etilenglicol en Aldrich (Milwaukee, WI). La solución salina tamponada con fosfato (PBS), 10x se adquirió en Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA). Se adquirieron lipopolisacárido conjugado con BODIPY® FL de *Escherichia coli*, serotipo 055:B5 (BODIPY-LPS) y el Kit de Ensayo de Lisozima EnzChek en Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). Se obtuvieron Pyrosol, Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL) Pyrotell-T, agua para reactivo LAL (LRW) y endotoxina patrón de control de *E. coli* O113:H10 (CSE) en Associates of Cape Cod, Inc. (Falmouth, MA). La resina SP Sepharose Fast Flow (SPFF), resina Q Sepharose Fast Flow (QFF) y columnas HR 10-10 eran de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). Las placas de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno transparente eran de Associates of Cape Cod, Inc. (Falmouth, MA) y las placas de microtitulación de 96 pocillos negras, de NUNC (Rochester, NY). Se adquirieron el ácido β-Hidroxitetradecanoico, ácido β-hidroxitridecanoico, ácido β-hidroxiundecanoico, β-hidroxitridecanoato, β-hidroxitetradecanoato y β-hidroxiundecanoato en Matreya, Inc. (Pleasant Gap, PA). El heptano se adquirió en Spectrum (New Brunswick, NJ).

Métodos

Mediciones de Viscosidad

Se usó un Viscosímetro de Brookfield Modelo 1 LVT equipado con un adaptador ULA-Y (Middleboro, MA) para las determinaciones de viscosidad. Todas las mediciones se realizaron a 20ºC.

Formación de Complejo de LPS-Proteína

Se prepararon soluciones madre de proteína en los tampones de equilibrado de columna hasta una concentración final de 10 a 11 mg/ml. Se preparó solución madre de LPS de O55:B5 en agua Milli-Q y se preparó solución madre de BODIPY-LPS en PBS o tampones de equilibrado de columna hasta una concentración final de 1 mg/ml. Esta es una concentración final de aproximadamente 100 μM basándose en un peso molecular de LPS de O55:B5 de 10.000 Da.

Los complejos de LPS-proteína se formaron añadiendo a un tubo de polipropileno 1 parte de solución de LPS con respecto a 9 partes de solución de proteína, v/v. El tubo se agitó vorticialmente, se envolvió en papel de aluminio y después se incubó a temperatura ambiente durante 16 a 72 horas para BSA y transferrina o se incubó a 37ºC durante al menos 4 horas para lactoferrina.

Análisis de LAL y BODIPY

Se usó un espectrofluorómetro de microplaca SpectraMax Gemini XS de Molecular Devices Co. (Sunnyvale, CA) para el ensayo de microplaca fluorescente BODIPY-LPS y un espectrofotómetro de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices) para el ensayo turbidimétrico cinético LAL (KTA). Los materiales de referencia se analizaron por triplicado y las muestras por duplicado o triplicado. Los resultados se representaron y analizaron usando el software SOFTmax PRO versión 3.1.1 (Molecular Devices).

A. *Ensayo de BODIPY-LPS*

Se prepararon diluciones seriadas de factor tres de la solución madre de BODIPY-LPS de 0,81 a 0,03 μM. El procedimiento analítico del ensayo de BODIPY-LPS era una modificación del ensayo usado por Yu y Wright (1996) del siguiente modo. A cada pocillo de una placa de microtitulación negra se añadieron 20 μl de SDS al 15%, preparado en agua Milli-Q, seguido de 180 μl de muestra o patrón. La placa se agitó durante 10 segundos a 37ºC y se leyó inmediatamente en modo de fluorescencia. Se determinaron las longitudes de onda óptimas de excitación (490 nm), emisión (525 nm) y de corte (515 nm) para el BODIPY-LPS. El ensayo para BODIPY-LPS demostró un intervalo lineal de 0,03 a 0,81 μM (de 54 a 1458 ng) con un límite de detección de valores/LOQ inferior a 0,01 μM (18 ng) y un límite de cuantificación de 0,03 μM (54 ng).

B. *Ensayo turbidimétrico cinético (KTA) de LAL*

Las muestras se ajustaron a un pH entre 6 y 8 con Pyrosol, si fue necesario. La CSE y Pyrotell-T se reconstituyeron con LRW. La curva lineal de CSE era de 0,03 a 1,00 UE/ml. El procedimiento analítico del KTA de LAL era el siguiente. A cada pocillo de una placa de microtitulación de poliestireno transparente se añadieron 100 μl de muestra o patrón y 100 μl de Pyrotell-T. Para muestras con adiciones se añadieron 5 μl de 2,00 UE/ml de CSE para obtener un nivel de CSE de 0,10 EU/ml. La placa se agitó durante 10 segundos y se recogieron los datos, cada minuto, en el modo cinético a 405 nm durante 1 hora a 37ºC.

C. *Análisis de LPS por Cromatografía de Gases*

El análisis cuantitativo para el nivel relativo de LPS presente en muestras por espectrometría de masas-cromatografía de gases (GCMS) se basaba en el método de Mielniczul *et al*. (1992) y utilizó un cromatógrafo de gases 6890 con un detector selectivo de masa 5973 de Agilent (Foster City, CA). La columna usada era una columna DB-5MS (d. i. 30 cm x 0,25 mm x grosor de película 0,25 μm) de J&W Scientific (Foster City, CA). La curva lineal para compuestos sustitutos y diana varió de 1,6 a 100 pg/μl y el patrón interno se mantuvo constante en 50 pg/μl. En resumen, el método de preparación de muestras y análisis por GCMS fue el siguiente. Se añadieron muestras y una cantidad conocida de sustituto, ácido β-hidroxitridecanoico a viales de reacción de vidrio de 5 ml. Las muestras acuosas se hidrolizaron en HCl 6 N de 90 a 100ºC durante una noche para liberar el ácido β-hidroxitetradecanoico del LPS. Los ácidos grasos se extrajeron dos veces del hidrolizado con heptano y después se secaron con nitrógeno. Los ácidos grasos se metilaron por incubación de 80 a 90ºC en HCl metanólico 3 N durante 30 minutos. Se añadió agua para detener la reacción y después se extrajeron dos veces los ésteres de metilo con heptano. Los ésteres de metilo se secaron después con nitrógeno. Los ésteres de metilo se derivatizaron añadiendo BSTFA/piridina (2: 1, v/v) e incubando de 80 a 90ºC durante 15 a 20 minutos antes de realizar la etapa de secado final con nitrógeno. Las muestras se reconstituyeron con un patrón interno de 50 pg/μl, ácido metil-3-trimetilsilil-undecanoico, preparado en heptano. Los patrones y las muestras se inyectaron en modo sin división y con un volumen de inyección de 1 μl. La temperatura inicial del horno se mantuvo a 90ºC durante 4 minutos y después se incrementó 20ºC por minuto hasta 250ºC seguido de un incremento de 10ºC por minuto hasta 300ºC. El espectrómetro de masas se ajustó para una tensión de compensación de EM de 500 y el retraso de disolvente en 5,2 minutos. Se usó el control con ión selectivo para controlar el metil-3-TMS-undecanoato en los iones 175 y 273, metil-3-TMS-tridecanoato en 11,0 minutos y los iones 175 y 301, y metil-3-TMS-tetradecanoato en 11,7 minutos y los iones 175 y 315. Se describieron cromatogramas usando Chemstation para el software de MSD Productivity.

Ensayo de Lisozima

Se determinó la actividad usando el Kit de Ensayo de Lisozima EnzChek de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Cromatografía

Todas las cromatografías se realizaron en un sistema ÄKTA explorer 100 FPLC (Amersham Biosciences) equipado con una bomba de gradiente (P-900), un bucle de inyección de 500 μl o 2000 μl, un detector de longitud de onda variable (UV-900) y un control de pH y conductividad (pH/C-900). Todos los experimentos cromatográficos se realizaron a un caudal de 200 a 300 cm/h a temperatura ambiente. Durante los lavados con alcanodiol, el caudal cayó de 150 a 200 cm/h para minimizar el aumento en la presión de retorno del sistema debido a la viscosidad aumentada de las soluciones de alcanodiol. Se describieron los cromatogramas usando el software Unicorn versión 3.21 o 4.0. Las resinas se introdujeron en columnas de 1 cm de diámetro hasta alturas de lecho de 7 a 11 cm. Los ÄKTA y las columnas se limpiaron con NaOH 0,5 N durante 60 a 120 minutos o NaOH 0,1 N durante más de 16 horas antes de cada proceso cromatográfico. Después, la columna y los ÄKTA se lavaron con agua Milli-Q justo antes del equilibrado del sistema con los tampones apropiados.

Se prepararon los alcanodioles, el etanol y el isopropanol como soluciones v/v con las mismas composiciones químicas y pH que los tampones de equilibrado, mientras que se prepararon 1,6-hexanodiol y Zwittergent 3-14 como soluciones p/v.

D. *Cromatografía de Intercambio Catiónico*

Para la transferrina, una columna de SP Sepharose Fast Flow se cargó con Acetato 100 mM, NaCl 1 M, pH 5 y se equilibró con Acetato 100 mM, pH 5. Después de la carga, la resina se lavó con el tampón de equilibrado y después se eluyó con fosfato sódico 50 mM, NaCl 1 M, pH 7,5. Cuando se realizó un lavado con orgánico o detergente, se aplicó después de la etapa de lavado inicial y se realizó durante 6 VC a menos que se indique de otro modo. A este lavado siguió un segundo lavado con tampón de equilibrado para retirar el orgánico o detergente antes de la elución.

La cromatografía para BSA fue idéntica a la de transferrina excepto porque el pH de todos los tampones de cromatografía era 4,5. Cuando se usó 1,2-hexanodiol como el agente de lavado, el eluyente se cambió a fosfato sódico 50 mM, NaCl 1 M, pH 7,5.

La cromatografía de lactoferrina fue similar a la de transferrina excepto porque la resina se cargó con cloruro sódico 1 M, fosfato sódico 20 mM, pH 7,5, se equilibró en fosfato sódico 20 mM, pH 7,5 y se eluyó con cloruro sódico 1 M, fosfato sódico 20 mM, pH 7,5.

La cromatografía para lisozima fue similar a la de para transferrina excepto porque la resina se cargó con NaCl 1 M, Tris 20 mM, pH 8,0, se equilibró en Tris 50 mM, pH 8,0 y se eluyó con NaCl 1 M, Tris 20 mM, pH 8,0.

E. *Cromatografía de Intercambio Aniónico*

Para BSA, una columna Q Sepharose Fast Flow se cargó con Tris 50 mM, NaCl 1 M, pH 8,0 y se equilibró con Tris 50 mM, pH 8,0. Después de la carga, la resina se lavó con el tampón de equilibrado. La BSA se eluyó con Acetato 25 mM, pH 4,5 y LPS con Acetato 25 mM, NaCl 1 M, pH 4,5. Cuando se realizó un lavado con alcanodiol, se insertó después de la etapa de lavado inicial y fue durante 6 VC. Un segundo lavado con tampón de equilibrado para retirar el alcanodiol siguió a este lavado.

Resultados y Discusión

La Tabla 1 resume los pesos moleculares y puntos isoeléctricos de las proteínas usadas en este estudio. Se ha demostrado que BSA, transferrina y lactoferrina se unen a LPS (Dzarski, 1994; Berger y Beger, 1987; y Appelmelk *et al*., 1994). Se usó lisozima para evaluar los efectos de los agentes de lavado sobre la actividad enzimática.

TABLA I

Pesos Moleculares y Puntos Isoeléctricos de Proteínas Usadas en este Estudio

Proteína	*Peso Molecular*	*pI*
Endotoxina con pocos o sin ácidos grasos de Albúmina bovina	**66400**	**5,56**
Transferrina, bovina holo	**75800**	**6,5**
Lactoferrina, bovina	**75200**	**8,52**
Lisozima, clara de huevo de pollo	**14300**	**9,65**

La Tabla II resume algunas de las propiedades físicas de los alcanodioles usados en este estudio. También se incluyen etanol e isopropanol, que se han usado para la retirada de LPS en otros procesos (Franken *et al.*, 2000), para comparación.

TABLA II

Propiedades Físicas de Alcanodioles Usados en este Estudio

Compuesto	[1]Punto de Ebullición	[1]Punto de Fusión	[1]Punto de Inflamación	[2]Límites de Explosión, aire		[2]Auto-ignición
				Inferior	Superior	
1,2-hexanodiol	223	NA	122	NA	NA	390
1,6-hexanodiol	250	45	147	6,6%	16%	319
1,5-pentanodiol	242	-16	129	1,4%	13,2%	NA
1,2-butanodiol	194	-50	93	2,4%	13,5%	390
1,4-butanodiol	230	16	121	1,95%	18,3%	420
1,3-propanodiol	214	-27	131	NA	NA	400
1,2-etanodiol	195	-13	111	3,2%	15,3%	40
Etanol	78,3	-114.1	12	3,3%	19%	363
Isopropanol	82,4	-88,5	12	2,5%	12%	460

[1]datos obtenidos de CabridgeSoft Corp. en Chemfinder.com
[2]datos de Material Data Safety Sheets
NA no disponible

Separación de Complejos de LPS-Proteína por Orgánicos y Detergente

Cromatografía en SP Sepharose Fast Flow de LPS y Complejos de LPS-Proteína

Se determinaron los perfiles de elución de LPS del propio LPS y los complejos de LPS-BSA en resina SP Sepharose Fast Flow por análisis KTA de LAL de fracciones de columna seleccionadas (Tabla III). Cuando el LPS se cromatografió a sí mismo, el LPS se detectó principalmente en la fracción no unida de lavado como era de esperar. La cromatografía de los complejos de LPS-BSA dio como resultado que la mayoría del LPS se detectara en la fracción de eluato de BSA confirmando la propiedad de unión a LPS de BSA (Dziarski, 1994) y demostrando que los complejos de BSA-LPS son estables en las condiciones de cromatografía de intercambio catiónico empleadas.

TABLA III

Perfiles de Elución de Cromatografía en SPFF de LPS y LPS-BSA

LPS y el complejo LPS-BSA se cromatografiaron en SP Sepharose Fast Flow. Las fracciones de columna se analizaron para LPS por el KTA de LAL como se describe en los métodos

	BODIPY-LPS (% de recuperación)		
Muestra	**Carga**	**Lavado no unido**	**Elución**
BODIPY-LPS	**100**	**82**	**5**
Complejo de BODIPY-LPS-BSA	**100**	**3**	**90**

El KTA de LAL es un ensayo de uso laborioso y costoso para determinar la distribución de LPS en las fracciones de columna. Se desarrolló un ensayo basado en fluorescencia para LPS para controlar las fracciones de columna. Este ensayo usó LPS marcado fluorescentemente, BODIPY-LPS, en lugar del LPS no marcado, que permite el análisis rápido de los eluatos de la columna por espectroscopia de fluorescencia. Se ha demostrado que la fluorescencia del marcador BODIPY en el conjugado de BODIPY-LPS se inactiva cuando el LPS forma complejos consigo mismo o con proteína. La adición de SDS a la muestra altera los complejos de LPS-LPS o LPS-proteína y da como resultado un aumento de fluorescencia (Yu y Wright, 1996). El ensayo se desarrolló como un ensayo basado en placa de microtitulación que permitió el análisis rápido y cuantitativo de BODIPY-LPS en las fracciones de cromatografía.

Para determinar si el marcador de BODIPY interfirió con la formación del complejo BSA-LPS o se comportó de forma diferente durante la cromatografía de intercambio catiónico, se repitió el análisis precedente usando BODIPY-LPS y complejos de BODIPY-LPS-proteína. Los perfiles de elución de BODIPY-LPS y complejos de BODIPY-LPS-proteína fueron similares (Tabla IV) a los perfiles de elución de LPS y LPS-BSA anteriormente. Esto demuestra que el marcador BODIPY no interfiere con la capacidad de la BSA o transferrina de unirse a LPS y que el grupo BODIPY no altera el perfil cromatográfico del LPS. La Figura 1 muestra perfiles típicos en SP Sepharose Fast Flow de BODIPY-LPS (A) y el complejo de BODIPY-LPS-transferrina (B).

TABLA IV

Perfiles de Elución de Cromatografía en SPFF de BODIPY-LPS y BODIPY-LPS-Proteína

BODIPY-LPS y el complejo de BODIPY-LPS-proteína se cromatografiaron en SP Sepharose Fast Flow. Las fracciones de columna se analizaron para BODIPY- LPS mediante el ensayo de BODIPY como se ha descrito en los métodos.

	BODIPY-LPS (% de recuperación)		
Muestra	**Carga**	**Lavado no unido**	**Elución**
Complejo de BODIPY-LPS	**100**	**82**	**5**
Complejo de BODIPY-LPS-BSA	**100**	**2**	**90**
Complejo de BODIPY-LPS-BSA-Transferrina	**100**	**6**	**74**

Reducción de LPS de Complejos de LPS-Proteína por Alcanodioles durante Cromatografía en SP Sepharose Fast Flow

Los experimentos iniciales examinaron la capacidad de una etapa de lavado con 1,6-hexanodiol al 50% de reducir la cantidad de BODIPY-LPS que había formado complejos con BSA durante la cromatografía de intercambio catiónico.

Un lavado de 3 volúmenes de columna (VC) con 1,6-hexanodiol disminuyó la cantidad de BODIPY-LPS que formaba complejos con BSA aproximadamente en el 21%. El aumento de la longitud de la etapa de lavado con 1,6-hexanodiol de 3 VC a 6 VC mejoró la retirada de BODIPY-LPS del complejo de BSA en aproximadamente el 49%. Aunque un aumento adicional de 3 VC en la etapa de lavado con 1,6-hexanodiol a 9 VC proporcionó una mejora (51%) en la retirada de BODIPY-LPS. Todos los experimentos adicionales se realizaron con una etapa de lavado con alcanodiol de 6 VC.

La eficacia de una serie de alcanodioles para retirar LPS de proteínas mientras que las proteínas estaban unidas a soportes sólidos iónicos se comparó con la de etanol, isopropanol y Zwittergent 3-14, que se había demostrado que son eficaces retirando LPS de una proteína de unión a LPS. Una columna de SP Sepharose Fast Flow se cargó con complejo de BODIPY-LPS-transferrina. La resina se lavó con seis volúmenes de columna de una solución de alcanodiol al 50% y después se eluyó. Se recogieron las fracciones y se ensayaron para BODIPY-LPS (Figura 2). Cuando la longitud de cadena del alcanodiol aumentó de cuatro a seis carbonos, la fluorescencia de las fracciones de lavado con alcanodiol aumentó, mientras que la fluorescencia de las fracciones del eluato disminuyó. Esto demostró que los alcanodioles retiraron BODIPY-LPS del complejo de transferrina. Las Figuras 3 y 4 ilustran los efectos de la estructura de alcanodiol en la retirada de BODIPY-LPS de transferrina y BSA, respectivamente. La eficacia de retirada de BODIPY-LPS aumentó con la creciente longitud de cadena del alcanodiol y los isómeros de 1,2-alcanodiol fueron más eficaces que los alcanodioles terminales retirando el BODIPY-LPS. El 1,2-hexanodiol fue el compuesto ensayado más eficaz y superó a los detergentes y alcoholes. El 1,2-butanodiol y 1,6-hexanodiol, así como isopropanol al 50% y etanol al 75% redujeron el BODIPY-LPS asociado con transferrina hasta niveles similares. La retirada de BODIPY-LPS por los alcanodioles fue similar para los complejos tanto de transferrina como de BSA.

La referencia a la Figura 2 ilustra los Perfiles de Elución de BODIPY- LPS de Complejos de BODIPY-LPS-Transferrina en SP Sepharose Fast Flow Junto con Lavados con Alcanodiol.

La Figura 3 ilustra la Reducción de BODIPY-LPS de Complejos de BODIPY-LPS-Transferrina en Eluatos de SP Sepharose Fast Flow por Alcanodioles. La cromatografía fue como se describe en la Figura 2. La reducción del cero por ciento se corresponde a un proceso de control sin un lavado con alcanodiol. 1, 1,2-hexanodiol; 2, Zwittergent 3-14 al 1%; 3, 1,6-hexanodiol; 4, etilenglicol; y 5, 1,4-butanodiol. Se generaron los complejos de BODIPY-LPS-transferrina, se cargaron en una columna de SP-Sepharose Fast Flow y la resina se lavó con soluciones al 50% de 1,4-butanodiol, 1,6-hexanodiol o 1,2-hexanodiol. Después de un lavado para retirar el alcanodiol, la transferrina se eluyó como se ha descrito en los métodos. La limpieza entre procesos fue con NaOH 0,5 N.

La Figura 4 ilustra la reducción de BODIPY-LPS de complejos de BODIPY-LPS-BSA en eluatos de SP Sepharose Fast Flow por alcanodioles. La cromatografía fue como se describe en la Figura 2. La reducción del cero por ciento se corresponde a un proceso de control sin un lavado con alcanodiol. 1, 1,2-hexanodiol; 2, Zwittergent 3-14 al 1%; 3, 1,2-butanodiol, 4, 1,6-hexanodiol; 5, isopropanol al 50%; 6, etanol al 75%; 7, 1,4-butanodiol; y 8, etilenglicol.

Se observó durante los experimentos con transferrina utilizando 1,2-hexanodiol en el lavado que cuando el pH del tampón de elución se mantuvo a un pH de 5, incluyendo NaCl 1 M, la transferrina no eluyó de la resina. Se observó una retención aumentada de transferrina hasta una concentración de 1,2-hexanodiol del 10%. A una concentración de 1,2-hexanodiol del 5%, la retención de transferrina no estaba alterada. La alteración en los tiempos de retención se ha observado para otras proteínas durante la cromatografía de intercambio iónico en presencia de polietilenglicol y otros polímeros neutros (Milby *et al*., 1989 y Gagnon *et al*., 1996). Los cambios en los tiempos de retención de proteína dependían del tamaño y la concentración del polietilenglicol y la propia proteína. Por otro lado, el etilenglicol hasta una concentración del 40% no produjo tiempos de retención de proteína (Tauc *et al*., 1998). Es importante señalar que en estos casos, el compuesto en investigación se incluyó en todos los tampones de cromatografía. Para el 1,2-hexanodiol, se incluyó solamente en un tampón de lavado que se retiró después por una etapa de lavado adicional antes de la elución de la proteína.

Ya que el 1,2-hexanodiol era el compuesto más eficaz ensayado para retirar BODIPY-LPS tanto de transferrina como de BSA, se investigó la dependencia de la concentración del lavado con 1,2-hexanodiol necesaria para afectar a esta retirada. Se determinó la reducción de BODIPY-LPS en la fracción del eluato de BSA en SP-Sepharose Fast Flow después de lavados con 1,2-hexanodiol que contenían 1,2-hexanodiol al 5%, al 20% y al 50%. El lavado con 1,2-hexanodiol al 5% dio como resultado una disminución de aproximadamente el 55% en el BODIPY-LPS asociado a BSA, mientras que la reducción de BODIPY-LPS por los lavados con 1,2-hexanodiol al 20% y al 50% era comparable aproximadamente en el 96%.

Además de transferrina y BSA, la retirada de BODIPY-LPS de complejos de lactoferrina por 1,6-hexanodiol también se examinó por ensayo de BODIPY fluorescente. Los resultados de los análisis se confirmaron después mediante análisis de las muestras para el compuesto marcador de LPS ácidos grasos 3-OH-14:0 por GC-MS. La Tabla V resume los datos y demuestra nuevamente la capacidad de un lavado con alcanodiol, en este caso, 1,6-hexanodiol, durante la cromatografía para reducir los niveles de BODIPY-LPS en el eluato de lactoferrina. Se observó una reducción de aproximadamente el 87% de BODIPY-LPS por el ensayo de fluorescencia de BODIPY y una reducción del 91% en el marcador de LPS por el ensayo GC-MS.

TABLA V

Perfiles de Elución de Cromatografía en SPFF de BODIPY-LPS y Complejos de BODIPY-LPS-Lactoferrina

Se generaron complejos de BODIPY-LPS-lactoferrina, se cargaron en una columna de SP Sepharose Fast Flow. Para procesos que incluyeron una solución al 50% de 1,6-hexanodiol, se incluyó un lavado para retirar el 1,6-hexanodiol antes de la elución de lactoferrina como se describe en los métodos. Las fracciones de columna se ensayaron para BODIPY y ácidos grasos 3-OH-14:0, como se describe en los métodos.

Muestra	BODIPY-LPS (% de recuperación) Ensayo GCMS/Ensayo con BODIPY de Fluorescencia			
	Carga	Lavado no unido	Lavado con Diol	Eluato
BODIPY-LPS (ningún lavado con diol)	100 (GCMS)	94	[1]N/A	5
	100 (fluor)	89	N/A	7
BODIPY-LPS-Lactoferrina (ningún lavado con diol)	100	62	N/A	48
	100	60	N/A	46
BODIPY-LPS-Lactoferrina (+lavado con diol)	100	63	[2]N/D	4
	100	66	26	6

[1]N/A – No aplicable.

[2]N/D – No se podría determinar por GCMS

Durante los procesos cromatográficos se observó un aumento en la presión de retorno de sistema cuando se aplicaron los lavados con alcanodiol. Se midió la viscosidad de cada solución orgánica y la solución Zwittergent, preparadas en Acetato 100 mM, pH 4,5 (Figura 5). La viscosidad de los alcanodioles se aumentó con la longitud de la cadena de carbono mientras que la viscosidad de los isómeros de 1,2-alcanodiol era ligeramente inferior que los isómeros de alcanodiol terminales. La viscosidad aumentada de las soluciones de alcanodiol puede presentar algunas dificultades en el cambio de escala. Los caudales de columna se tienen que ajustar para mantener una presión de sistema adecuada para el equipamiento que se está usando. La capacidad de usar concentraciones inferiores de los alcanodioles para retirar LPS de los complejos de proteína-LPS aliviaría parcialmente este problema. Por ejemplo, lavados con 1,2-hexanodiol al 20% y al 50% reducen de forma eficaz el BODIPY-LPS hasta aproximadamente los mismos niveles para los complejos de BSA como se ha indicado anteriormente. La viscosidad de 1,2-hexanodiol al 20% es aproximadamente un tercio de la del hexanodiol al 50%, 2,6 Cp en comparación con 7,5 Cp.

Reducción de LPS de Complejos de LPS-Proteínas por Alcanodioles durante Cromatografía en Q Sepharose Fast Flow

La retirada de LPS de complejos de LPS- proteína es más compleja en resinas de intercambio aniónico, especialmente para proteínas básicas. Durante la cromatografía de intercambio catiónico, el LPS, estando cargado negativamente, no se atrae al grupo funcional de la resina y se elimina por lavado de la columna durante el lavado con alcanodiol mientras que la proteína permanece unida en las condiciones de lavabo. Durante la cromatografía de intercambio aniónico, el LPS y la proteína se retienen ambos por los grupos funcionales de la resina. Por lo tanto, se necesita alterar los complejos y tiene que tener lugar una elución diferencial de la proteína y el LPS.

Se investigó la capacidad de 1,6-hexanodiol y 1,2-hexanodiol de reducir los niveles de BODIPY-LPS de los complejos de BSA-LPS durante la cromatografía de intercambio aniónico en resina Q Sepharose Fast Flow. Los dos isómeros, 1,2- y 1,6- de hexanodiol se seleccionaron ya que los mismos eran los compuestos más eficaces reduciendo los niveles de BODIPY-LPS de complejos con proteína durante la cromatografía de intercambio catiónico.

La elución de la BSA de la resina de intercambio aniónico después de la aplicación de un lavado con 1,2-hexanodiol se alteró como se observó para la transferrina en la resina de intercambio catiónico. El aumento de la concentración de sales del tampón de elución para afectar a la elución de la BSA después del lavado con 1,2-hexanodiol dio como resultado la co-elución de BODIPY-LPS libre con la BSA. Se seleccionó un esquema de elución alternativo basándose en el pH. Después de que hubiera finalizado el lavado con 1,2-hexanodiol y hubiera tenido lugar una eliminación por lavado del 1,2-hexanodiol, la BSA se eluyó a pH 4,5. A esto siguió una separación de la resina, que rescató el BODIPY-LPS remanente, con un tampón de pH 4,5 que contenía NaCl 1 M. La Tabla VI resume el efecto de 1,2-hexanodiol en la retirada de BODIPY-LPS de complejos de BODIPY-LPS-BSA. La inclusión del lavado con 1,2-hexanodiol redujo el BODIPY-LPS del eluato de BSA aproximadamente el 29% con una elución aparente del BODIPY-LPS desplazado a las fracciones de lavado con 1,2-hexanodiol.

TABLA VI

Los Perfiles de Elución en QFF de BODIPY-LPS y Complejos de BODIPY-LPS-BSA

BODIPY-LPS y complejo de BODIPY-LPS-BSA se cromatografiaron en Q Sepharose Fast Flow. Las fracciones de columna se analizaron para BODIPY- LPS por el ensayo de BODIPY como se describe en los métodos.

	BODIPY-LPS (% de recuperación)				
Muestra	**Carga**	**Lavado no unido**	**Lavado con Diol**	**Eluato**	**Separado**
BODIPY-LPS (ningún lavado con diol)	**100**	**1**	**[1]NA**	**0**	**42**
BODIPY-LPS-BSA (ningún lavado con diol)	**100**	**7**	**NA**	**17**	**52**
BODIPY-LPS-BSA (+lavado con diol)	**100**	**2**	**12**	**5**	**45**

[1]NA – No aplicable.

Efecto de Alcanodiol sobre Actividad Enzimática

Se usó la lisozima para determinar el efecto de los agentes de lavado sobre la actividad enzimática y, por lo tanto, indirectamente, los efectos desnaturalizantes de los agentes de lavado durante la cromatografía con SP Sepharose Fast Flow. La lisozima se cromatografió con y sin un lavado con 1,6-hexanodiol al 50% de 6 VC o un lavado con 1,2-hexanodiol y las cargas y los eluatos de la columna se ensayaron para actividad de lisozima usando un ensayo de

actividad de lisozima con microplaca de fluorescencia. Los lavados con hexanodiol no tuvieron efectos perjudiciales sobre la actividad de lisozima. Los lavados con etanol al 75%, isopropanol al 50% y Zwittergent 3-14 al 1% tampoco tuvieron ningún efecto sobre la actividad de lisozima.

Referencias

1. **Heine**, H., **Rietschel**, E. Th. y **Ulmer**, A. J., (2001) The biology of endotoxin. *Mol. Biotechnol*. 19, 279-296.

2. **Petsch**, D. y **Anspach**, F. B., (2000) Endotoxin removal from protein solutions. *J. Biotechnol*. 76, 97-119.

3. **Franken**, K. L. M. C., **Hiemstra**, H. S., van **Meijgaarden**, K. E., **Subronto**, Y., den **Hartigh**, J., **Ottenhoff**, T. H. M. y **Drijfhout**, J. W. (2000) Purification of His-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: The benefits from the use of organic solventes. *Protein Expr. Purif* 18, 95-99.

4. **Wilson**, M. J., **Haggart**, C. L., **Gallagher**, S. P. y **Walsh**, D. (2001) Removal of tightly bound endotoxins from biological products *J. Biotechnol*. 88, 67-75.

5. **Fiske**, M. J., **Fredenburg**, R. A., **VanDerMeid**, K. R., **McMichael**, J. C. y **Arumugham**, R. (2001) Method for reducing endotoxin in Moraxella catarrhalis UspA2 protein preparations *J. Chromatogr*. B 753, 269-278.

6. **Hauser**, T. A. y **Hayenga**, K. J. (2002) Method for purification of molecules using unbranched terminal alkyl-diols. *Organización Mundial de Propiedad Intelectual*, Publicación Internacional Número WO02/07479 A1.

7. **Fahrer**, R. L., **Lester**, P. M., **Blank**, G. S. y **Reifsnyder**, D.H. (1999) Nonflammable preparative reversed-phase liquid chromatography of recombinant human insulin-like growth factor-I. *J. Chromatogr*. A 830, 127-134.

8. **Fahrer**, R. L. y **Reifsnyder**, D. (2001) Purification of molecules Patente de Estados Unidos Nº de Patente: US 6.265.542 B1.

9. **Yu**, B. y **Wright**, S. D. (1996) Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein: Transfer of LPS to soluble CD14. *J. Biol. Chem*. 271, 4100-4105.

10. **Gagnon**, P., **Godfrey**, B. y **Ladd**, D. (1996) Method for obtaining unique selectivities in ion-exchange chromatography by addition of organic polymers to the mobile phase. *J. Chromatogr.* A 743, 51-55.

11. **Mielniczuk**, Z., **Alugupalli**, S., **Mielmczuk**, E. y **Larsson**, L. (1992) Gas chromatography-mass spectrometry of lipopolysaccharide 3-hydroxy fatty acids: comparison of pentafluorobenzoyl and trimethylsilyl methyl ester derivatives. *J. Chromatogr*. 623, 115-122.

12. **Dziarski**, R. (1994) Cell-bound albumin is the 70-kDa peptidoglycan-, lipopolysaccharide-, and lipoteichoic acid-binding protein on lymphocytes and macrophages. *J. Biol. Chem*. 269, 20431-20436.

13. **Appelmelk**, B. J., **An**, Y. Q., **Geerts**, M., **Thijs**, B. G., de **Boer**, H. A., **MacLaren**, D. M., de **Graaff**, J. y **Nuijens**, J. H. (1994) Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect. Immun*, 62, 2628-2632.

14. **Berger**, D. y **Beger**, H. G. (1987) Evidence for endotoxin binding capacity of human Gc-globulin and transferrin. *Clin. Chim. Acta* 163, 289-299.

15. **Tauc**, P., **Cochet**, S., **Algiman**, E., **Callebaut**, I., **Cartron**, J. -P., **Brochon**, J. C. y **Bertrand**, O. (1998) Ion-exchange chromatography of proteins: modulation of selectivity by addition of organic solvents to mobile phase. Application to single-step purification of a proteinase inhibitor from corn and study of the mechanism of selectivity modulation. *J. Chromatogr*. A 825, 17-27.

16. **Milby**, K. H., **Ho**, S. V. y **Henis**, J. M. S. (1989) Ion-exchange chromatography of proteins. The effect of neutral polymers in the mobile phase. *J. Chromatogr*. A 482, 133-144.

[i] T. A. **Hauser** y K. J. **Hayenga**, *Organización Mundial de Propiedad Intelectual*, Publicación Internacional Número WO02/074791 A1 (2002).

[ii] R. L. **Fahmer**, P. M. **Lester**, G. S. **Blank**, y D. H. **Reifsnyder**, *J. Chromatogr*. A 830 (1999) 127-134.

[iii] R. L. **Fahmer** y D. **Reifsnyder** Patente de Estados Unidos Nº de Patente: US 6.265.542 B1 (2000).

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para retirar una endotoxina de proteínas producidas de forma recombinante que comprenden un complejo de Lipopolisacárido (LPS)-proteína que comprende las etapas de:

inmovilizar el complejo en una resina cromatográfica;

lavar la resina con un alcanodiol por lo que al menos una porción del LPS se separa del complejo; y

eluir al menos una porción de la proteína de la resina.

2. El proceso de la reivindicación 1, en el que el alcanodiol se selecciona del grupo que consiste en 1,5-pentanodiol, 1,6-hexanodiol, 1,2-hexanodiol, 1,2-butanodiol, 1,4-butanodiol y 1,7-heptanodiol.

3. El proceso de la reivindicación 1, en el que la resina se selecciona del grupo que consiste en una resina de intercambio catiónico y una resina de intercambio aniónico.

4. El proceso de la reivindicación 1, en el que la proteína se selecciona del grupo que consiste en albúmina bovina (BSA), holo-transferrina bovina, lactoferrina, lisozima y proteínas de choque térmico.

5. El proceso de la reivindicación 1, en el que la proteína está fijada a la resina.

6. El proceso de la reivindicación 1, en el que el LPS está fijado a la resina.

7. El proceso de la reivindicación 1, en el que más de aproximadamente el 95% de la proteína eluída de la resina carece de LPS u otra endotoxina.

8. El proceso de reivindicación 7, en el que se usa un cambio en pH o conductividad para eluir la proteína de la resina.

9. El proceso de la reivindicación 1, en el que la proteína se produce por un sistema de expresión bacteriano.

10. El proceso de reivindicación 9, en el que el sistema de expresión bacteriano se selecciona del grupo que consiste en un sistema de expresión de *E. coli*, un sistema de expresión *Caulobacter crescent* y un sistema de expresión de *Proteus mirabilis*.

11. El proceso de la reivindicación 1, en el que la resina está en un entorno altamente salino.

12. El proceso de la reivindicación 11, en el que el alcanodiol es 1,2-hexanodiol.

13. El proceso de la reivindicación 12, en el que la proteína se eluye cambiando el pH.

14. Un proceso para separar una endotoxina de una proteína que comprende las etapas de fijar la proteína a una resina y lavar la resina con un alcanodiol por lo que se separa al menos una porción de la endotoxina.

15. El proceso de la reivindicación 14, en el que la endotoxina es una impureza creada por la producción de la proteína.

16. El proceso de la reivindicación 14, en el que se separa más del 99,9% de la endotoxina de la proteína.

17. Un proceso para retirar una endotoxina de proteínas producidas de forma recombinante que comprende un complejo de Lipopolisacárido (LPS)-proteína que comprende las etapas de:

fijar el LPS del complejo a una resina cromatográfica de intercambio aniónico;

lavar la resina con un alcanodiol por lo que al menos una porción del LPS se separa del complejo; y

eluir al menos una porción de la proteína de la resina.

Figura 1a

A

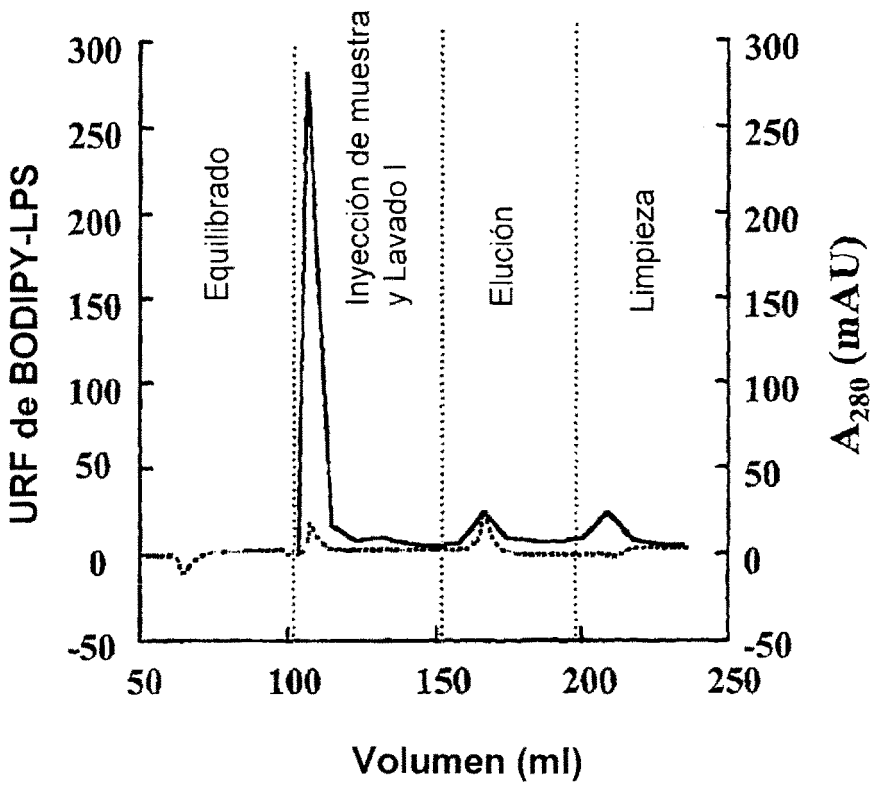

URF de BODIPY-LPS
300
250
200
150
100
50
0
-50
Equilibrado
Inyección de muestra
y Lavado I
Elución
Limpieza
50
100
150
200
250
Volumen (ml)
A_{280} (mAU)

Figura 1b

B

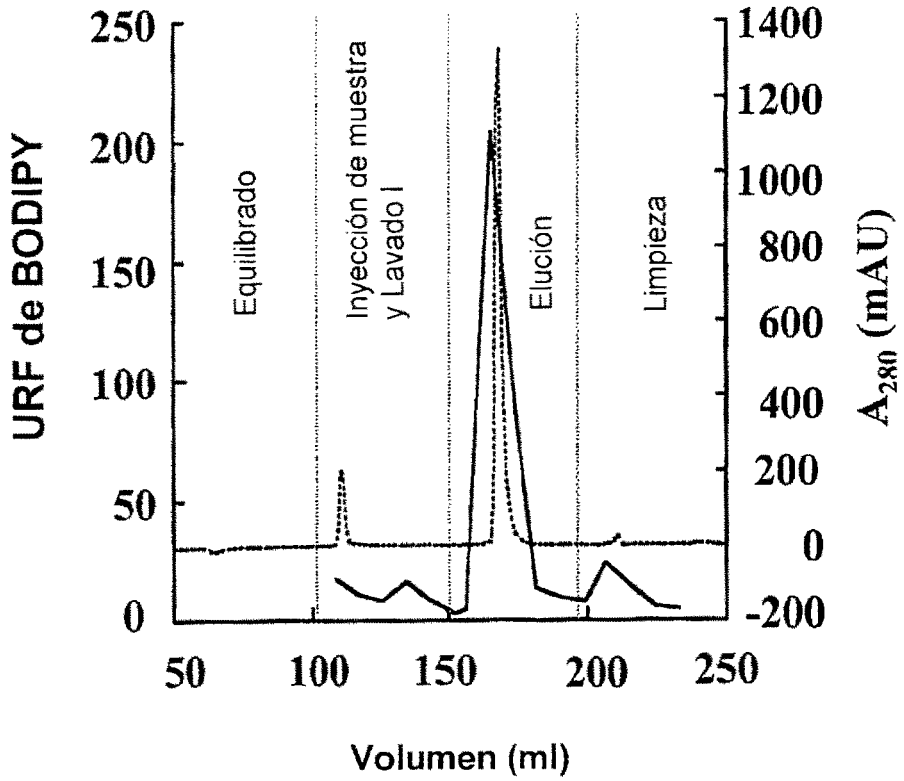

URF de BODIPY
250
200
150
100
50
0
Equilibrado
Inyección de muestra
y Lavado I
Elución
Limpieza
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
A_{280} (mAU)
50
100
150
200
250
Volumen (ml)

Figura 2

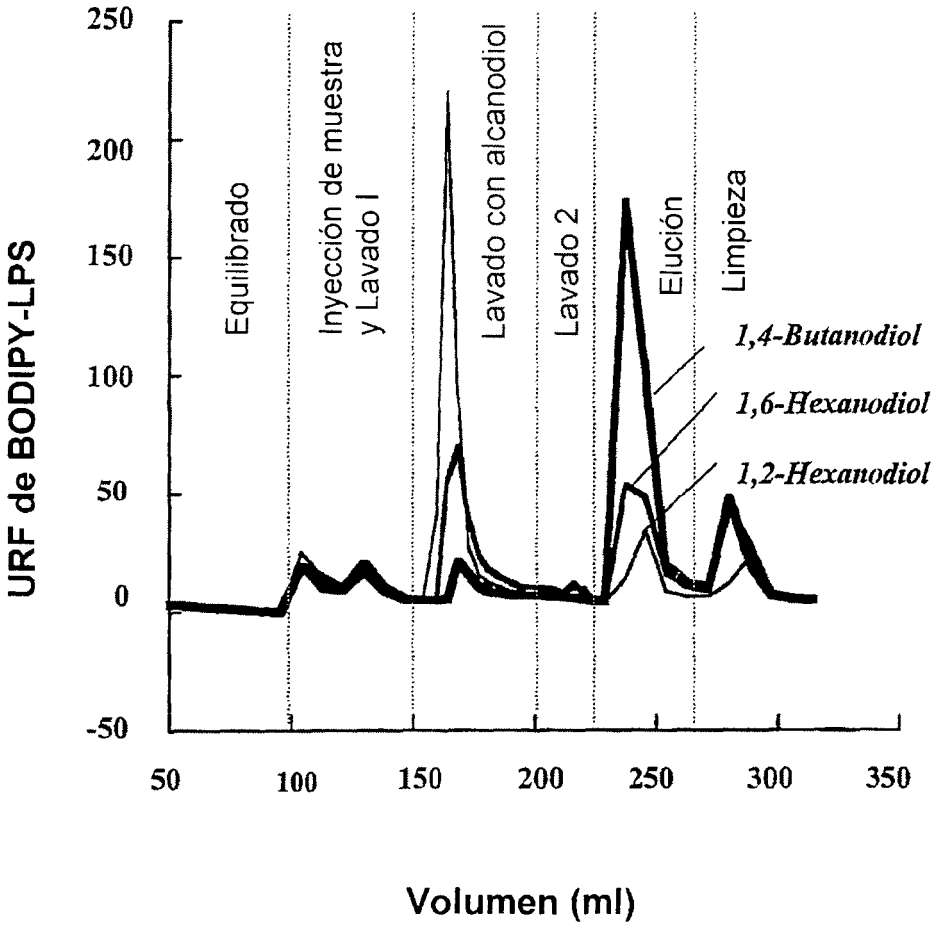

250
200
150
100
50
0
-50
URF de BODIPY-LPS
Equilibrado
Inyección de muestra y Lavado I
Lavado con alcanodiol
Lavado 2
Elución
Limpieza
1,4-Butanodiol
1,6-Hexanodiol
1,2-Hexanodiol
50
100
150
200
250
300
350
Volumen (ml)

Figura 3

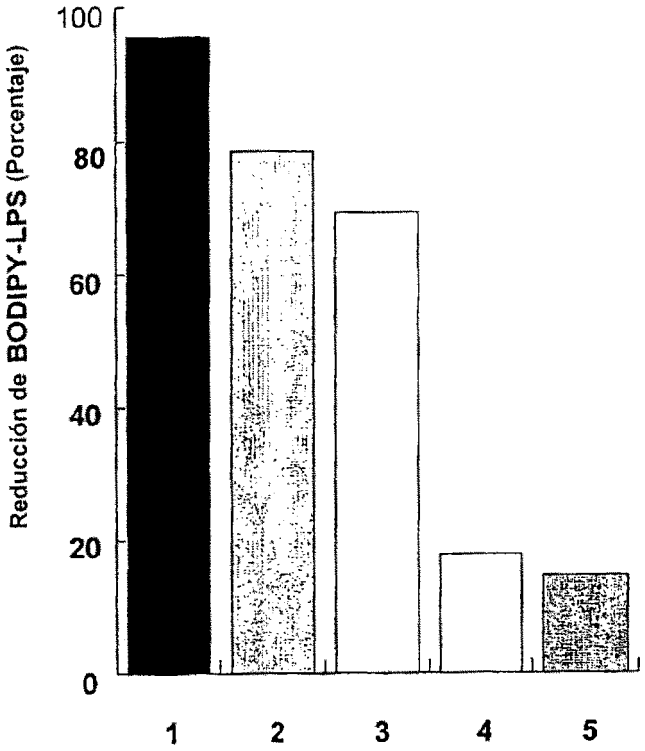
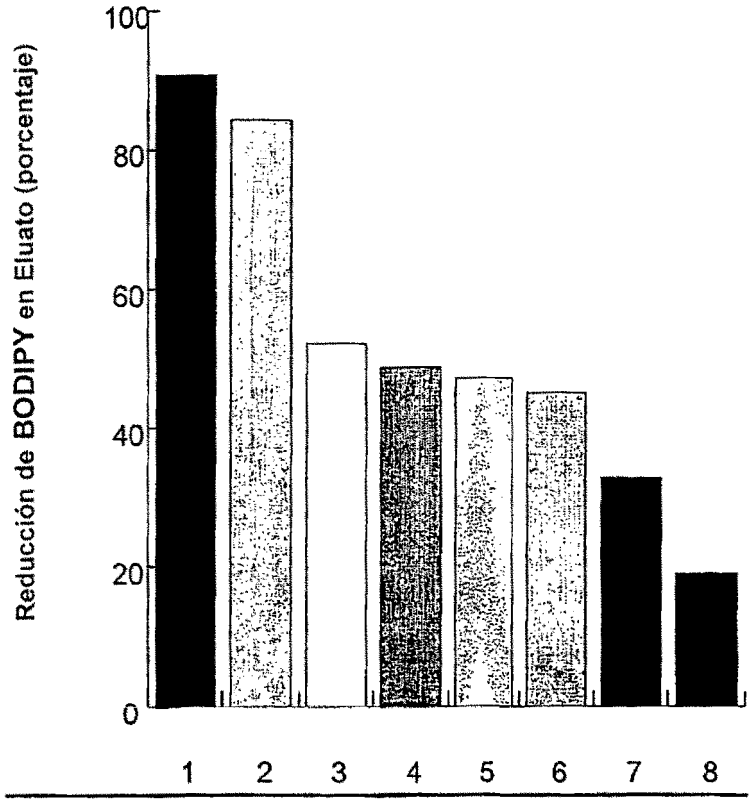


Figura 4


Reducción de BODIPY en Eluato (porcentaje)
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
5
6
7
8

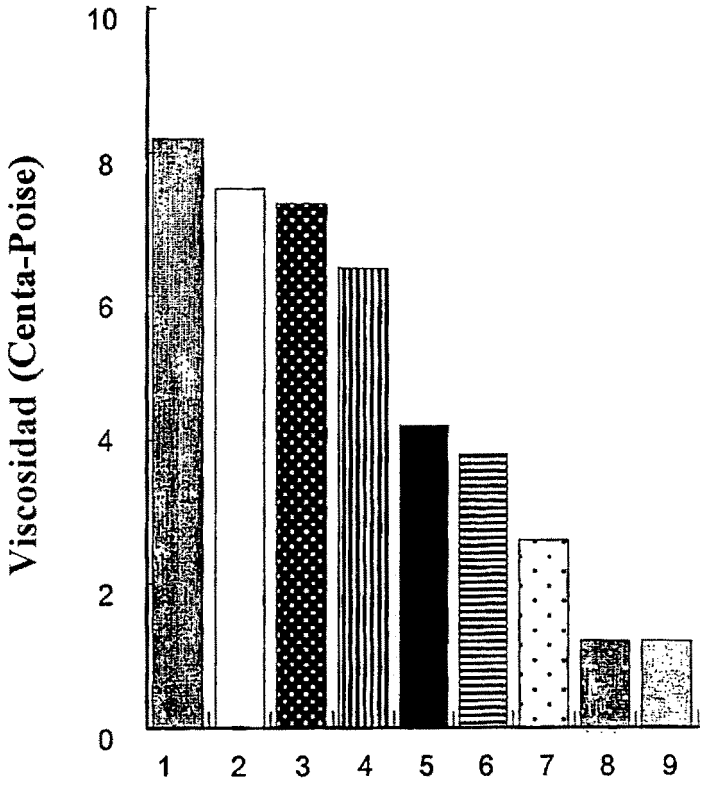



Figura 5