



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0309992-0 B1**



**(22) Data do Depósito: 09/05/2003**

**(45) Data de Concessão: 22/12/2020**

**(54) Título:** MÉTODO PARA PURIFICAR ALBUMINA DE SORO HUMANO RECOMBINANTE (rHSA) DE UMA SOLUÇÃO

**(51) Int.Cl.:** C07K 14/765; C07K 1/16.

**(30) Prioridade Unionista:** 15/05/2002 SE 0201518-8.

**(73) Titular(es):** GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB; NORTH CHINA PHARMACEUTICAL GROUP CORPORATION.

**(72) Inventor(es):** MAKONNEN BELEW; MEI YAN LI; WEI ZHANG.

**(86) Pedido PCT:** PCT SE2003000766 de 09/05/2003

**(87) Publicação PCT:** WO 2003/097692 de 27/11/2003

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 12/11/2004

**(57) Resumo:** MÉTODO PARA PURIFICAR ALBUMINA DE SORO HUMANO RECOMBINANTE (rHSA) DE UMA SOLUÇÃO. A presente invenção é um método de purificar albumina de soro humano recombinante (rHSA: recombinant human serum albumin) de uma matriz bimodal altamente tolerante a sal; cromatografia de interação hidrofóbica (HIC); e troca de ânions. A matriz bimodal de troca de cátions altamente tolerante a sal utilizada permite uma purificação de um sobrenadante de cultura de células diretamente, no sentido de que não é mais necessária diluição adicional do mesmo. Devido a sua alta capacidade de ligação, referida matriz bimodal de troca de cátions também permite o uso de uma quantidade menor de matriz em comparação com uma matriz de trocador de ânions convencional correspondente. Assim, a presente invenção permite economia substancial no que se refere a volumes e, consequentemente, a custos de operação.

"MÉTODO PARA PURIFICAR ALBUMINA DE SORO HUMANO RECOMBINANTE (rHSA) DE UMA SOLUÇÃO" 7

Campo técnico

A presente invenção refere-se ao campo da purificação de proteína e, particularmente, à purificação de albumina de soro humano. O método utiliza uma série de etapas de cromatografia, o que resulta numa purificação eficiente vantajosa para uso em operações em grande escala.

Anterioridades

Albumina do soro humano (HSA: *Human Serum Albumin*) é a proteína mais abundante presente no plasma sanguíneo, onde seu papel consiste em contribuir para a manutenção da pressão osmótica e para ligar nutrientes e metabólitos, para, com isto, favorecer o transporte dos mesmos. Há um grande interesse farmacêutico e científico na HSA, p. ex. como uma droga para tratar hipoalbuminemia causada por uma perda de albumina ou uma redução na síntese de albumina, no choque hemorrágico etc. Nos métodos mais antigos disponíveis, a HSA foi purificada do sangue. No entanto, referidos métodos carrearam problemas, como por exemplo fornecimento esporádico de sangue, desvantagens econômicas e contaminação com substâncias indesejadas, como vírus da hepatite, e inclusive o vírus da AIDS. Para evitar estes problemas, desenvolveu-se métodos alternativos baseados em técnicas de DNA recombinante para produzir HSA recombinante (rHSA). Embora se haja sugerido um grande número de métodos recombinantes, mostrou-se que a purificação do rHSA a partir do caldo de fermentação é uma etapa crucial, e há uma necessidade existente de aperfeiçoamentos para tal fim.

A EP 0 612 761 descreve um método para produzir albumina de soro humano recombinante de alta pureza, que não contém contaminantes não-antigênicos livres. O método utiliza cromatografia de interação hidroscópica (HIC: *hydrophobic interaction chromatography*) em condições

especificadas combinadas com outras etapas, como cromatografia de troca de íons, tratamento com ácido bórico ou um sal do mesmo, seguido de ultrafiltração, e tratamento com calor. No entanto, uma série daquelas muitas etapas ainda será complexa demais e, correspondentemente, cara demais para uso satisfatório em operação em grande escala na indústria.

A EP 0 570 916 também descreve um método para produzir albumina de soro humano recombinante por meio de técnicas de manipulação de genes, sendo que a purificação é por meio de uma combinação de etapas em que um sobrenadante de cultura é submetido a ultrafiltração, tratamento com calor, tratamento com ácido e outra ultrafiltração, seguido de tratamentos subseqüentes com um trocador de cátions, um veículo de cromatografia hidrofóbica e um trocador de íons, e de dessalinização. No entanto, de forma semelhante à patente indicada acima, este esquema de purificação é por demais complexo, demorado e, correspondentemente, caro demais para proporcionar um procedimento eficiente para uso em operação em grande escala.

A EP 0 699 687 descreve um método de purificação de rHSA em que meio de cultura é tratado com calor para inativar proteases e depois contactado com um leito fluidizado de partículas de troca de cátions. O eluente pode ser submetido subseqüentemente a ultrafiltração, HIC e cromatografia de troca de íons. No entanto, o uso de um leito fluidizado exigirá equipamento diferente para a etapa cromatográfica de leito recheado convencional. Assim, ainda há uma necessidade de procedimentos mais eficientes e economicamente atraentes para purificação de rHSA de um caldo de cultura.

#### Sumário da invenção

Um objeto da presente invenção é o de proporcionar um método para purificação de HSA recombinante que é facilmente adaptado a operação em grande escala. Isto é obtido por meio de um método que

compreende submeter um sobrenadante de cultura de células (CCS: *Cell Culture Supernatant*) compreende rHSA às seguintes etapas:

(a) cromatografia de troca de cátions em uma matriz bimodal tolerante a alto teor de sal;

5 (b) cromatografia de interação hidrofóbica (HIC: *hydrophobic interaction chromatography*);

(c) cromatografia de troca de ânions.

O método de acordo com a invenção compreende menos etapas de método do que os métodos discutidos acima. Adicionalmente, a

10 matriz de troca de cátions bimodal tolerante a alto teor de sal usada na etapa (a) permite o uso de um sobrenadante de cultura de células sem qualquer diluição adicional, que é uma característica vantajosa porque reduz em muito o volume total e, portanto, os custos, em comparação com os métodos do estado da técnica.

15 Outro objeto da invenção é o de aperfeiçoar a capacidade de adsorção das etapas cromatográficas usadas na purificação de rHSA. Isto pode ser obtido com o método descrito acima em que um trocador de cátions, compreendendo ligandos conhecidos como ligandos com alta concentração de sal (HSL: *high salt ligands*), é usado na etapa (a). Os referidos ligandos são 20 bimodais no sentido de que eles compreendem pelo menos dois sítios que interagem com a substância a ser isolada, um proporcionando uma interação carregada, e um proporcionando uma interação baseada em ligações de hidrogênio e/ou uma interação hidrofóbica.

25 Outro objeto da invenção consiste em diminuir ainda mais o teor de cor, e, mais especificamente, em incrementar ainda mais o teor de pureza, do produto final. Isto pode ser obtido com o uso do método descrito acima, em que se utiliza um trocador de ânions fracos.

#### Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 A-D ilustra possíveis materiais de matriz

adequados para uso nas diferentes etapas de troca de cátions, interação hidrofóbica e cromatografia de troca de cátions de acordo com a invenção.

A Figura 2 mostra os resultados de cromatografia de troca de cátions de acordo com a etapa (a) do método de acordo com a invenção de um sobrenadante de cultura de células não-diluído (CCS: *Cell Culture Supernatant*). A Fração 2B contém o rHSA.

A Figura 3 mostra os resultados de HIC da fração 2B da Fig. 2. O rHSA é eluído na fração 3A.

A Figura 4 mostra os resultados de cromatografia de troca de ânions da fração 3 A da Fig. 3. O rHSA purificado é eluído na fração 4B.

A Figura 5 mostra análises de eletroforese das frações principais obtidas utilizando-se o protocolo de purificação de três etapas de acordo com a presente invenção.

#### Descrição detalhada da invenção

Um aspecto da presente invenção é um método de purificar albumina de soro humano recombinante (rHSA) a partir de uma solução, sendo que o referido método compreende submeter um sobrenadante de cultura de células (CCS) compreende rHSA às etapas cromatográficas a seguir:

- (a) troca de cátions em uma matriz bimodal tolerante a alta concentração de sal;
- (b) cromatografia de interação hidrofóbica (HIC); e
- (c) troca de ânions.

Em uma concretização específica do presente método, a condutividade do CCS é acima de cerca de 10 mS/cm, como acima de cerca de 15 e, de preferência, acima de cerca de 20, p. ex. cerca de 25-50, ou mais particularmente de 25-30 mS/cm, quando aplicado na etapa (a), que é possível devido ao tipo de trocador de cátions usado, que compreende ligandos do tipo conhecido como ligandos com alta concentração de sal (HSL). Assim, uma

vantagem importante com o presente método é que ele evita a necessidade de diluir o CCS, e, com isso, permite o uso de volumes muito reduzidos de amostra durante a etapa de troca de cátions em comparação com os métodos previamente descritos para purificação de rHSA.

5 O CCS pode ser qualquer caldo de fermentação do qual, de preferência, se removeu células, p. ex. por meio de centrifugação. Assim, a origem do rHSA isolado de acordo com a presente invenção pode ser qualquer hospedeiro adequado, como células microbianas, como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* etc, células de levedura, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* etc, ou linhas de células animais. Em uma concretização vantajosa, a célula hospedeira é *Pichia pastoris*. Métodos para produzir uma célula hospedeira recombinante e condições para expressão de uma proteína, como rHSA, da mesma são bem conhecidos, ver p. ex. a EP 0 612 761 discutida acima para uma referência aos diversos pedidos de patente 10 15 neste campo.

A finalidade principal da etapa (a) é a de eliminar substâncias coloridas com baixo peso molecular, como pigmentos que são carregados negativamente. Assim, a etapa (a) utiliza um trocador de cátions, que compreende ligandos do tipo conhecido como ligandos com alta concentração 20 de sal (HSL). Neste contexto, "alta concentração de sal" refere-se à propriedade indicada acima de tolerância a alta concentração de sal que é característica para esta classe de trocadores de íons. Esta propriedade é proporcionada pela natureza dos ligandos, que é bimodal no sentido de que cada ligando compreende dois grupos capazes de interagir com a substância a 25 ser isolada, no caso presente rHSA. O modo de ligação primário é proporcionado por um grupo de ligação carregado, i.e. um grupo de troca de íons, daí a classificação do tipo de HSL de matrizes como trocadores de íons. Um segundo modo de ligação é proporcionado por um grupo de ligação secundário, que proporciona uma interação adicional com a substância a ser

isolada. Usualmente, o grupo de ligação secundária proporciona uma ligação de hidrogênio ou uma interação hidrofóbica, porém é possível considerar outras interações, como será discutido mais detalhadamente abaixo. Neste contexto, deve-se observar que o termo "bimodal" é usado aqui para definir que dois ou mais modos de ligação estão envolvidos, e portanto não se limita apenas a dois modos de ligação. No presente pedido utiliza-se trocadores de cátions do tipo HSL, e referidos trocadores de cátions foram divulgados em detalhe, ver p. ex. PCT/EP01/08203 (Amersham Pharmacia Biotech AB). No entanto, uma descrição geral dos mesmos será dada abaixo.

O grupo de ligação carregado presente em um ligando catiônico com alta concentração de sal (HSL) pode ser selecionado do grupo constituído de sulfonato ( $\text{-SO}_3^-/\text{-SO}_3\text{H}$ ), sulfato ( $\text{-OSO}_3^-/\text{-OSO}_3\text{H}$ ), carboxilato ( $\text{-COO}^-/\text{-COOH}$ ), fosfato ( $\text{-OPO}_3^{2-}/\text{-OPO}_3\text{H}^-/\text{-OPO}_3\text{H}_2$ ) e fosfonato ( $\text{-PO}_3^{2-}/\text{-PO}_3\text{H}^-/\text{-PO}_3\text{H}_2$ ). Em uma concretização vantajosa, o trocador de cátions de tipo HSL é um trocador de cátions fracos, i.e. trocadores de cátions que apresentam um  $pK_a$  acima de 3. Em uma concretização alternativa, eles são fortes trocadores de cátions que apresentam um  $pK_a$  inferior a 3. Exemplos típicos de referidos trocadores de cátions fracos são carboxilato ( $\text{-COO}^-/\text{-COOH}$ ), fosfato ( $\text{-OPO}_3^{2-}/\text{-OPO}_3\text{H}^-/\text{-OPO}_3\text{H}_2$ ) e fosfonato ( $\text{-PO}_3^{2-}/\text{-PO}_3\text{H}^-/\text{-PO}_3\text{H}_2$ ).

O grupo de ligação secundária compreende pelo menos um átomo de ligação de hidrogênio que se encontra localizado a uma distância de 1-7 átomos do grupo trocador de cátions. Um átomo de ligação de hidrogênio é um átomo que é capaz de participar na ligação de hidrogênio (exceto hidrogênio), ver Karger *et al.*, An Introduction into Separation Science, John Wiley & Sons (1973) página 42. O átomo de ligação de hidrogênio pode ser selecionado do grupo que consiste de heteroátomos, como oxigênios (oxigênio de carbonila, o de éter, oxigênio de éster, oxigênio de hidroxila, oxigênio de sulfona, oxigênio de sulfona amida, oxigênio de sulfóxido,

oxigênio em anéis aromáticos etc.), nitrogênios (nitrogênio de amida, nitrogênio em anéis aromáticos etc), enxofres (enxofre de tioéter, enxofre em anéis aromáticos etc); e carbonos hibridados com  $sp$ - e  $sp^2$ ; e grupos halo, como flúor, cloro, bromo ou iodo, de preferência flúor. O segundo grupo de ligação tipicamente não contém átomo carregado ou átomo que é carregável com uma alteração de pH.

A estabilidade dos ligandos de troca de cátions usados na etapa (a) pode ser definida em termos gerais como a capacidade de resistir a NaOH 0,1 ou 1 M em água durante pelo menos 40 horas. Para exemplos ilustrativos de estruturas de ligandos químicos vantajosos dos trocadores de cátions úteis na etapa (a) do presente método, ver PCT/EP01/08203 indicado acima. Em uma concretização específica do presente método, a etapa (a) utiliza o ligando de troca de cátions de HSL ilustrado na Fig. 1A da presente descrição.

Definido em termos funcionais, o trocador de cátions usado na etapa (a) do presente método é capaz de

(a) ligação rHSA por meio de troca de cátions em um líquido de referência aquoso a uma força iônica correspondente a 0,3 M de NaCl e,

(b) permitir uma capacidade de ultrapassar para a substância  $\geq$  200 %, como  $\geq$  300 % ou  $\geq$  500 % ou  $\geq$  1000 %, da capacidade de ultrapassar da substância para um trocador de cátions de referência contendo grupos sulfopropila  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$  às forças iônicas mostradas acima.

A PCT/EP01/08203 descreve um trocador de íons de referência do tipo referido de maneira mais detalhada. O nível de ligandos de troca de cátions nos trocadores de cátions usados no método inventivo é selecionado usualmente no intervalo de 1-4000  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  de matriz, como de 2-500  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  de matriz, preferindo-se 5-300  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  de matriz. Faixas possíveis e preferidas são determinadas, entre outras, pela natureza da matriz, do ligando etc. Assim, o nível de ligandos de troca de cátions encontra-se usualmente dentro da faixa de 10-300 para matrizes à base de agarose. Para

matrizes à base de dextrano, o intervalo é tipicamente de 10-600 µmol/ml de matriz.

O PCT/EP01/08203 indicado acima também compreende um extensiva discussão de materiais de matriz úteis com trocadores de cátions de tipo HSL. Em resumo, referidas matrizes podem ser usadas sobre material orgânico ou inorgânico. Este é, de preferência, hidrofilico e na forma de um polímero, que é insolúvel e mais ou menos intumescível em água. Polímeros hidrofóbicos que foram derivatizados para tornarem-se hidrofilicos estão incluídos nesta definição. Polímeros adequados são polímeros de poliidroxila, p. ex. baseados em polissacarídeos, como agarose, dextrano, celulose, amido, pululano, etc. e polímeros completamente sintéticos, como amida poliacrílica, polímeros completamente sintéticos, como amida poliacrílica, amida polimetacrílica, poli(éteres de hidroxialquilvinila), poli(hidroxialquilatos) e polimetacrilatos (p. ex. poliglicidilmetacrilato), alcoóis de polivinila e polímeros baseados em estirenos e divinilbenzenos, e copolímeros em que dois ou mais dos monômeros correspondendo aos polímeros indicados acima estão incluídos. Polímeros, que são solúveis em água, podem ser derivatizados para se tornarem insolúveis, p. ex. por meio de reticulação e por meio de acoplamento a um corpo insolúvel via adsorção ou ligação covalente. É possível introduzir grupos hidrofílicos em polímeros hidrofóbicos (p. ex. em co-polímeros de monovinila e divinilbenzenos) por meio de polimerização de monômeros apresentando grupos que podem ser convertidos a OH, ou por meio de hidrofilização do polímero final, p. ex. por meio de adsorção de compostos vantajosos, como polímeros hidrofílicos. Um exemplo ilustrativo de uma matriz vantajosa é a Sepharose perolizada comercialmente obtenível, que é à base de agarose e disponível junto à Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia. Materiais inorgânicos vantajosos a serem utilizados como matrizes de suporte são sílica, óxido de zircônio, grafite, óxido de tântalo, etc.

O PCT/EP01/08203 indicado acima compreende uma

revelação extensiva da preparação de trocadores de cátions de tipo HSL. Uma revisão de métodos de imobilizar compostos formadores de ligando sobre superfícies também é dada em Hermanson, G. T., Mallia, A. K. & Smith, P. K., (Eds.), Immobilisation Affinity Ligand Techniques, Academic Press, INC, 5 1992.

Como indicado acima, um dos benefícios dos trocadores de íons de tipo HSL é que é possível realizar adsorção na coluna, i.e. ligação de rHSA ao ligando, a elevadas forças iônicas, em comparação com o que normalmente foi realizado para trocadores de cátions convencionais, por 10 exemplo, o trocador de sulfopropila de referência discutido acima. A força iônica exata a ser usada durante a ligação depende da natureza da proteína e do tipo de concentração do ligando na matriz. Forças iônicas úteis freqüentemente correspondem a concentrações de NaCl (água pura)  $\geq 0,1\text{ M}$ , como  $\geq 0,3\text{ M}$  ou ainda  $\geq 0,5\text{ M}$ . É possível realizar dessorção, p. ex., 15 incrementando-se a força iônica e/ou por meio de aumento do pH. Sais típicos a serem usados para modificação da resistência iônica são selecionados dentre amônio solúvel ou sais de metal de fosfatos, sulfatos, etc, em particular sais de metal alcalino-terroso e/ou de metal de álcali. Também é possível usar os mesmos sais nas etapas de adsorção, porém então freqüentemente em 20 concentrações menores.

Em uma concretização do presente método, a quantidade de matriz de troca de cátions usada na etapa (a) é cerca de metade da quantidade de matriz de HIC usada na etapa (b). Assim, uma vantagem da presente invenção é a excelente capacidade de ligação da matriz de troca de cátions 25 bimodal que permite uma redução de volume e, portanto, de custos operacionais, em comparação com trocadores de cátions convencionais. Na presença de uma concentração elevada de sal, tal como a uma condutividade de cerca de 25-30 mS/cm, a adsorção de Sepharose SP comercialmente obtêniável para rHSA é de cerca de 2-4 mg/ml de gel recheado, enquanto que

foi possível demonstrar que a adsorção do protótipo de ligando com alta concentração de sal (Fig. 1A) era de pelo menos 50 mg/ml. Assim, o uso do ligando com alta concentração de sal (HSL) bimodal simplifica claramente e aperfeiçoa significativamente o método de purificação e reduz o custo de operação em grande escala.

Uma concretização do presente método compreende tratamento com calor do CCS antes da etapa (a). O aquecimento pode ser realizado diretamente, i.e. enquanto as células hospedeiras ainda estão presentes ou após a remoção das mesmas, como por meio de centrifugação, ultrafiltração ou qualquer outro método vantajoso. O aquecimento pode ser realizado a 50-100°C durante um período de 1 minuto até várias horas, de preferência a 60-75°C durante 20 minutos a 3 horas e, da forma mais preferível, a cerca de 68°C durante cerca de 30 minutos. O aquecimento é realizado vantajosamente em um banho de água equipado com termostato. Em uma concretização, adiciona-se um estabilizador antes do aquecimento, como caprilato de sódio, a um pH de cerca de 6,0. É possível utilizar outros estabilizadores, como acetiltriptofano, ácidos carboxílicos orgânicos etc. Após o aquecimento, o pH do CCS é ajustado, de preferência, a um valor mais baixo vantajoso para a adsorção subsequente em um trocador de cátions, como pH 4,5.

Em outra concretização do presente método, o produto da etapa (a), i.e. a fração ligada à coluna comprendendo a matriz de tipo HSL, é tratada com calor antes da etapa (b). De preferência, adiciona-se um agente redutor, como cisteína. Outros exemplos de agentes redutores úteis são mercaptoetanol, glutationa reduzida etc. A finalidade disto é facilitar a remoção de substâncias coloridas durante a etapa (b). Este tratamento com calor é realizado geralmente como descrito acima, embora na concretização preferida, se utilize uma temperatura ligeiramente inferior, como de cerca de 60°C durante um período ligeiramente mais longo, como de cerca de 60

minutos.

Como indicado acima, a etapa (b) do presente método utiliza cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). O objetivo principal da etapa (b) é o de remover produtos de degradação proteolítica de rHSA, sendo que referidos produtos têm usualmente um tamanho de cerca de 10-50 kDa. HIC é um princípio bem conhecido na técnica da cromatografia, e proporciona uma ferramenta versátil para separação baseada em diferenças na hidrofobicidade superficial. Mostrou-se que muitas biomoléculas que são consideradas hidrofílicas ainda expõem suficientes grupos hidrofóbicos para permitir interação com os ligados hidrofóbicos ligados à matriz cromatográfica. HIC já foi sugerido para a purificação de rHSA, ver p. ex. EP 0 699 687. Comparada com outro princípio de separação conhecido, ou seja, cromatografia de fase invertida, a HIC utiliza uma densidade muito menor de ligando na matriz. Esta característica promove um grau maior de seletividade, enquanto permite condições brandas de eluição para auxiliar a conservar a atividade biológica da proteína de interesse. No presente contexto, a etapa de HIC é usada para adsorver os produtos de degradação proteolítica de rHSA mencionados acima, enquanto que o rHSA de comprimento pleno é eluído na fração não-ligada. A interação hidrofóbica entre o rHSA e o ligando imobilizado na matriz é incrementada por meio de uma pequeno incremento da força iônica dos tamponantes usados. Há muitos materiais de separação comercialmente obteníveis para HIC hoje em dia, e a presente invenção não se limita a qualquer ligando e/ou matriz específica. Assim, em termos gerais, a matriz usada na etapa (b) pode basear-se em um material orgânico ou inorgânico. No caso de materiais orgânicos, pode ser, por exemplo, um polímero nativo, como agarose, dextrano, celulose, amido etc, ou um polímero sintético, como divinilbenzeno, estireno etc. No caso de materiais de matriz inorgânicos, sílica é um material bem conhecido e comumente usado. Em uma concretização vantajosa, a matriz é agarose reticulada, que é

comercialmente obtêniável de diversas companhias, como Sepharose<sup>TM</sup> da Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia). Em uma concretização, a matriz de HIC usada na etapa (b) apresenta um ou mais ligandos hidrofóbicos capazes de interação com rHSA, selecionados do grupo que consiste de fenila, butila, como n-butila, octila, como n-octila, etc, preferivelmente em uma matriz de agarose. Alternativamente, ligandos hidrofóbicos, como éteres, isopropila ou fenila estão presentes em uma matriz de divinilbenzeno, como Source<sup>TM</sup> da Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia). Na concretização mais preferida, ligandos de fenila em uma matriz de agarose reticulada são usados na etapa (b). A matriz é constituída, de preferência, de pérolas porosas, que podem apresentar um teor de água acima de cerca de 90 %, preferivelmente de cerca de 94 %. O tamanho médio das partículas pode ser, por exemplo, entre 10 e 150 µm conforme medido em uma pérola molhada, de preferência abaixo de 100, como cerca de 90 µm. A densidade do ligando na matriz pode ser, por exemplo entre 20 e 60, como de cerca de 40 µmol/ml de gel. Como um exemplo específico, a matriz usada é Phenyl Sepharose<sup>TM</sup> 6 Fast Flow da Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia). Neste caso, a denominação Fast Flow é usada para uma matriz cuja reticulação foi otimizada para proporcionar características de fluxo adaptadas ao método, com taxas de fluxo típicas de 300-400 cm/h através de uma altura de leito de 15 cm a uma pressão de 1 bar. No entanto, a pessoa versada na arte pode facilmente adaptar referidos parâmetros de método dependendo da escala da operação. Esta etapa pode ser realizada a um pH de cerca de 4-8, como 6,5-7, e a uma concentração salina de cerca de 0,01 a 0,5 M, como de 0,05 a 0,2 M.

25 Como também se indica acima, a etapa (c) do presente método utiliza um trocador de ânions, de preferência um trocador de ânions fracos, para remover impurezas menores da etapa (b), e particularmente para remover compostos indesejados, como pigmentos com baixo peso molecular. A invenção não se limita ao uso de qualquer material trocador de ânions

específico, desde que apresente uma quantidade suficiente de ligandos capaz de ligar compostos de carga negativa que são indesejáveis no produto de rHSA final. A etapa cromatográfica de troca de ânions pode ser realizada, por exemplo, a um pH de cerca de 5,0-8,0 e a uma concentração salina de 0,01 a 5 0,2 M para remoção das impurezas. No que se refere ao material de matriz, este pode ser qualquer material orgânico ou inorgânico, como discutido acima. Em uma concretização preferida, a matriz constitui-se de pérolas porosas de agarose reticulada, como Sepharose<sup>TM</sup> da Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia). Os ligandos ligados à mesma são trocadores de ânions 10 fracos, cujo grupo de ligação é, por exemplo, uma amina primária ou secundária. Um grupo de ligação do tipo referido pode ser ligado à matriz, p. ex. via uma cadeia alquila com um grupo éter mais próximo da matriz. A literatura descreve muitas maneiras de ligar um grupo de ligação a uma matriz via espaçadores, braços etc, e como indicado acima a presente invenção não 15 se limita a qualquer estrutura específica. Em uma concretização ilustrativa, utiliza-se uma pérola de agarose apresentando ligandos de acordo com a fórmula a seguir -O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>H, p. ex. DEAE Sepharose<sup>TM</sup> da Amersham Biosciences. Esta concretização resultará em rHSA tanto na fração ligada como na fração não-ligada eluída da coluna que, para algumas 20 concretizações é satisfatória.

No entanto, uma concretização alternativa que é mais vantajosa no que se refere à pureza do produto final, consiste em se utilizar uma pérola de agarose apresentando ligandos que compreendem dois grupos éster, e, de preferência, também dois grupos hidroxila. De preferência, o 25 grupo de ligação é então amina primária. A vantagem com esta concretização é que o rHSA só estará presente na fração que é ligada moderadamente à matriz, resultando em uma pureza muito aperfeiçoada e em conveniência operacional. Uma fórmula geral ilustrativa para esta concretização indicada por último é apresentada na Fig. 1, no entanto comprehende-se que a presente

invenção também compreende um método em que se utiliza estrutura semelhantes na etapa (c).

No entanto, deve-se compreender que a presente invenção também abrange o uso de matrizes semelhantes às de acima, que se baseiam na mesma estrutura geral do ligando. Da mesma forma, comprehende-se que a denominação "Gel" na fórmula da Fig. 1A inclui qualquer matriz, como discutido acima em relação à etapa (b). Um exemplo comercialmente obtêivel de uma matriz comprehendendo o ligando descrito acima é ButylSepharose<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). Nos experimentos apresentados acima utilizou-se uma densidade de ligando de 160 µmoles/ml. Assim, parece que é possível obter resultados particularmente vantajosos otimizando-se a densidade de ligando da matriz. Também parece que quando se usa o primeiro tipo mencionado de trocadores de ânions, i.e. matrizes do tipo DEAE, torna-se necessário um volume maior, como cerca de três vezes o volume, se comparado com o meio de Butil-Sepharose mencionado por último. Assim, a concretização preferida do presente método utiliza uma amina secundária como o grupo trocador de ânions durante a etapa (c) e uma densidade de ligando de pelo menos cerca de 100 µmoles/ml.

Em uma concretização específica, a densidade de ligando do trocador de ânions situa-se na faixa de 50-300, como de 100-200 e, de preferência, cerca de 160 µmoles/ml. Uma vantagem é que o rHSA purificado pode então ser recuperado apenas da fração ligada da etapa (c), em comparação com, p. ex., DEAE quando este pode estar presente tanto em frações ligadas como em não-ligadas.

## **25 Descrição detalhada dos desenhos**

As Figuras 1A-D ilustram possíveis estruturas de ligando adequadas para uso no presente método. Mais especificamente, a Fig. 1A mostra um tipo de trocador de cátions de tipo ligando com alta concentração de sal (HSL), a Fig. 1B mostra uma matriz de cromatografia de interação

hidrofóbica, ou seja, Fenil Sepharose, e as Fig. 1 C e 1 D mostram dois trocadores de ânions alternativos, ou seja uma fórmula generalizada incluindo a estrutura da DEAE Sepharose comercialmente obtêvel (Fig. 1 C quando n = 0) e a butil-Sepharose modificada, que compreende uma maior densidade de ligando, como descrito abaixo.

A Figura 2 mostra os resultados da etapa (a), i.e. cromatografia de troca de cátions de 147 ml de sobrenadante de cultura não-diluído (CCS: *cell culture supernatant*) em uma coluna de 20 ml compreendendo uma matriz de troca de cátions com a estrutura de ligando ilustrada na Fig. 1A. A 10 Fração 1B contém o rHSA, que é claramente separado das impurezas representadas pela fração 2A.

A Figura 3 mostra os resultados da etapa (b), i.e. cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) da fração 2B da Fig. 2 em uma coluna de 40 ml de Fenil Sepharose como ilustrado na fig 1B. Fração A representa o rHSA.

A Figura 4 mostra os resultados da etapa (c), i.e. cromatografia de ânions da fração 3 A da Fig. 3 em uma coluna de 40 ml compreendendo a butil-Sepharose modificada como descrito na parte experimental abaixo. O rHSA purificado encontra-se na fração 4B.

A Figura 5 mostra análises de PAGE nativo (8-25 %) e SDS-PAGE (10-15 %) das frações principais obtidas durante o método de três etapas de acordo com a invenção. Para PAGE nativo visualizado com manchamento de prata (5A) aplicou-se cerca de 3,3 µg de proteína por ponto. Para SDS-PAGE visualizado com manchamento de prata (5B) aplicou-se cerca de 2 µg de proteína por ponto. Para SDS-PAGE visualizado por meio de manchamento com Coomassie (5C) aplicou-se cerca de 10 µg de proteína por ponto. 1: CCS; 2: HSL Cat. Ex. (não-ligado); 3: HSL Cat. Ex. (ligado); 4: Fenila (não-ligado); 5. Fenila (ligado); 6: HiSub. Butila; 7: HiSub. Butila (ligado); 8: HSA (controle). As setas mostram as posições de rHSA.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiais e métodos

O sobrenadante de cultura de células (CCS) contendo rHSA foi preparado por meio de fermentação de células de *P. pastoris* geneticamente modificadas durante 2 semanas ou mais, seguido de separação das células por meio de filtração. O CCS, que apresentava cor verde, foi dividido em frações de cerca de 200 ml e armazenado a -20°C até o uso. A qualidade do CCS foi determinada por meio de filtração em gel numa coluna analítica de Superdex<sup>TM</sup> 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). Esta análise deu as quantidades relativas de impurezas de alto peso molecular (HMW: *high molecular weight*) e baixo peso molecular (LMW: *low molecular weight*) no CCS e também o teor aproximado da forma monomérica de rHSA.

Caprilato de sódio (ácido octanóico, sal de Na) e L-cisteína foram adquiridos da SIGMA Chemical Co. HSA purificado cromatograficamente de plasma humano foi gentilmente cedido por I. Andersson na unidade de processamento de plasma da Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia. A concentração de proteína em várias amostras foi determinada utilizando-se o kit de análise de proteína Bio Rad Protein Assay *kit* (conhecido como o método Bradford). Utilizou-se albumina de soro bovino (BSA) para construir a curva padrão. Realizou-se medições de absorção de UV/Vis utilizando um espectrofotômetro registrador Shimadzu UV-160A (Shimadzu Corporation, Japão). Todos os outros produtos químicos usados foram de classe analítica ou de reagente.

Realizou-se eletroforese analítica utilizando-se um sistema de eletroforese Phastgel e meio PhastGel apropriado e tiras de tamponante (todos da Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). As análises eltroforésicas foram realizadas utilizando-se géis PAGE nativo (8-25 %) ou SDS-PAGE (não-reduzido, 10-15 %) de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade de amostra aplicada por ponto foi a seguinte: cerca de 3,3 µg para

amostras nativas e de 2 µg para as amostras tratadas com SDS, ambas obtidas com o kit de manchamento com prata [*Silver Staining Kit*] (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia); 10 µg para as amostras tratadas com SDS que foram manchadas com Coomassie Brilliant Blue (CBB).

5 Análises espectrométricas de massa (que visa determinar a massa de rHSA purificado e HSA derivado de plasma) foram realizada pelo Dr. J. Flensburg na Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia, utilizando um instrumento MALDI-TOF. O mapeamento de peptídeos da digestão tríptica do HSA nativo e recombinante também foi realizada utilizando-se este 10 instrumento. Os resultados obtidos desta última análise servem para estabelecer a seqüência primária mais provável do rHSA com referência às seqüências conhecidas dos peptídeos trípticos gerados de HSA purificado.

#### Sistema de cromatografia e matrizes

Os experimentos cromatográficos foram realizados à 15 temperatura ambiente (cerca de 23°C) utilizando um sistema AKTA<sup>TM</sup> Explorer 100 controlado por programa UNICORN<sup>TM</sup> (versão 3.1) (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). A matriz de separação usada para a etapa (b) é Fenil Sepharose<sup>TM</sup> 6 Fast Flow (*high sub*), um produto regular da Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia. Para a etapa (c) utilizou-se ou DEAF 20 Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) comercialmente obtinível, ou produziu-se uma matriz modificada: Butil Sepharose<sup>TM</sup> 6 Fast Flow (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) com uma densidade incrementada de ligando (batelada U238025:160 µmol/ml) em comparação com o produto comercial (20-40 µmol/ml de gel). Esta matriz 25 modificada será denominada aqui "Butil-Sepharose modificada". Além disso, na etapa (a) utilizou-se uma matriz de protótipo de tipo HSL-type, trocador de cátions, ver Fig. 1A. Este meio foi recheado em uma coluna de vidro XK26/20 como uma suspensão espessa em 20 % de etanol para se obter um volume de leito de 40 ml. Utilizou-se uma taxa de fluxo linear de 300 cm/h. A

coluna recheada foi lavada com cerca de 2 volumes de leito de água desionizada para eluir a maior parte do etanol e, depois, equilibrada com uma solução tamponante apropriada antes da aplicação da amostra. A quantidade de tamponante requerida para cada uma das etapas cromatográficas 5 utilizando-se os diversos meios é mostrada na Tabela 1 abaixo.

#### Tamponantes

Tamponante A: Acetato de sódio a 25 mM, pH 4,5

Misturar 25 ml de acetato de sódio 1 M e 40 ml de ácido acético 1 M e diluir a 1 l de água desionizada. Condutividade: cerca de 2 10 mS/cm à temperatura ambiente (t. a.).

Tamponante B: 50 mM de fosfato de sódio, 0,1 M de NaCl, 10 mM de caprilato de sódio, pH 7,0.

Misturar 155 ml, 0,2 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 95 ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 15 M + 5,8 g de NaCl + 1,66 g de caprilato de sódio e diluir a 1 l com água desionizada. Condutividade: cerca de 16 mS/cm à temperatura ambiente.

Tamponante C: 50 mM de fosfato de sódio, 0,1 M de NaCl, pH 6,0.

Misturar 212 ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M + 38 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 15 M + 5,8 g de NaCl e diluir a 1 l com água desionizada. Condutividade: 14 mS/cm à temperatura ambiente.

Tamponante D: 50 mM de fosfato de sódio, 0,2 M de NaCl, pH 6,0.

Misturar 212 ml, 0,2 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 38 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 20 M + 11,7 g de NaCl e diluir a 1 l com água desionizada. Condutividade: 22 mS/cm à temperatura ambiente.

Tamponante E: Solução de limpeza-no-local [(CIP: *Cleaning-in-place*)

25 30 % de isopropanol dissolvido em solução 1 M de NaOH.

#### Exemplo: Purificação de rHSA

#### Tratamento com calor de sobrenadante de cultura de células (CCS)

Antes da cromatografia de troca de cátions, o CCS foi tratado com calor primariamente para inativar enzimas proteolíticas produzidas

durante a fermentação de *P. pastoris*. Isto foi realizado da seguinte maneira:

A amostra congelada de CCS foi descongelada e dissolveu-se 10 mM de caprilato de Na. O pH foi ajustado em 6,0 e aqueceu-se durante 30 minutos em um banho de água (mantido a 68°C com termostato). A amostra 5 foi resfriada à temperatura ambiente e seu pH foi ajustado em 4,5. Caso se utilizasse um meio de troca de cátions convencional, como SP Sepharose BB, para a etapa (a), teria sido necessário diluir o CCS de 2-8 vezes, dependendo da condutividade original da solução, com água desionizada para se atingir uma condutividade de cerca de 5-10 mS/cm (concentração salina 10 aproximadamente 0,1 M).

No entanto, a matriz de tipo HSL usada de acordo com a presente invenção é muito mais tolerante a concentrações salinas incrementadas, e, portanto, o CCS tratado com calor pode ser aplicado normalmente na etapa (a) sem qualquer diluição adicional, desde que sua 15 condutividade seja menor do que cerca de 30 mS/cm.

O rHSA parcialmente purificado obtido após a troca de cátions de acordo com a etapa (a) (i.e. a fração ligada à matriz de tipo HSL) também foi tratado com calor antes da etapa (b) como a seguir: O pH da amostra foi ajustado em 6,0 com 1 M de NaOH e adicionou-se a isto cisteína numa 20 concentração de 5 mM para servir como um agente redutor. Esta solução foi então aquecida durante 60 minutos em um banho de água mantido a 60°C. A finalidade principal desta operação é facilitar a remoção de substâncias coloridas por meio da matriz de HOC.

#### Etapa (a): Captura utilizando-se cromatografia de troca de cátions

25 O meio de troca de cátions foi recheado em uma coluna XK 16/20 (volume de leito recheado de 20 ml) e lavado com 2 volumes de coluna (CV) de Tamponante A para equilíbrio. O CCS tratado com calor foi aplicado na coluna via um Superloop<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) de 150 ml a uma taxa de fluxo de 300 ml/h (150 cm/h). A quantidade de rHSA

aplicada foi de cerca de 1 g (i.e. 50 mg de rHSA/ml de gel recheado). Após aplicação da amostra, o material não-ligado foi eluído com 3 CV [volumes de coluna] de Tamponante A seguido de eluição do rHSA ligado com 5 CV de Tamponante B. As duas frações foram combinadas separadamente e o pH da fração ligada foi ajustado em 6,0 com uma solução 1 M de NaOH. Em seguida, a solução foi tratada como descrito acima, resfriada à temperatura ambiente e ainda mais purificada numa coluna de HIC como descrito abaixo. Guardou-se uma fração de 1 ml de cada fração combinada para fins analíticos (i.e. para determinar o teor de proteína, a relação  $A_{350}/A_{280}$  e análise eletroforésica).

Regeneração: A coluna foi lavada com 2 CV de Tamponante E para eluir substâncias mui fortemente ligadas e restaurar a função do gel. A coluna foi deixada descansando de um dia para o outro na mesma solução e, depois, lavada com 4 CV de água desionizada para eluir a maior parte do NaOH e iso-propanol. A coluna regenerada foi re-equilibrada com 4 CV de Tamponante A antes do ciclo seguinte do método de adsorção/dessorção.

#### Etapa (b): Etapa de purificação utilizando HIC

A fração contendo rHSA da etapa precedente foi transferida para uma um Superloop<sup>TM</sup> de 150 ml e aplicado numa coluna XK26/20 recheada com Fenil Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (*high sub*), volume de leito recheado de 40 ml. A coluna foi pré-equilibrada com 3 CV de Tamponante C. Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 2 CV de Tamponante C para eluir o material não-ligado que contém o rHSA. O material ligado (contendo principalmente a forma degradada de 45 kDa de rHSA) foi eluído com 2 CV de água desionizada.

Regeneração: O mesmo procedimento que acima.

#### Etapa (c): Etapa de polimento utilizando troca de ânions fracos

As duas frações obtidas da etapa de HIC precedente foram combinadas e frações de 1 ml de cada uma foram guardadas para

determinações analíticas (ver acima). Um coluna foi recheada (XK26/20) foi recheada com DEAE Sepharose™ Fast Flow ou a Butil-Sepharose modificada descrita acima para se obter um volume de leito recheado de 40 ml. Cada um dos meios recheados foi lavado com 2 CV de água desionizada e depois com 5 cerca de 5 CV de Tamponante C para equilibrar os mesmos. A fração não-ligada obtida da etapa de HIC foi transferida para um Superloop de 150 ml e aplicada sobre uma ou sobre a outra das duas colunas de acima. A fração não-ligada foi eluída com 6 CV de Tamponante C (da coluna de DEAE Sepharose Fast Flow) ou com 2 CV da coluna de Butil-Sepharose modificada. A fração ligada foi eluída com 2 CV de uma solução 2 M de NaCl (para a coluna de DEAE) ou com 5 CV de Tamponante D para a coluna de Butil-Sepharose modificada. A taxa de fluxo foi mantida em 90 cm/h durante toda a operação.

Regeneração: O mesmo procedimento que acima.

Os protocolos de eluição otimizados de acordo com a invenção 15 durante cada um dos meios usados encontram-se resumidos na Tabela 1. A pessoa versada neste campo pode facilmente ampliar a escala do método descrito acima para operações em escala-piloto ou em escala de produção.

Tabela 1:

O número de volumes de coluna (CV) de soluções de equilíbrio, eluição e 20 regeneração requeridos para cada etapa de cromatografia

Matriz	Equilibrar	Lavar (tamponante)	Eluir	Regenerar	Lavar (Água desionizada)
trocador de cátions de tipo HSL	4 [A]	3 [A]	5 [B]	2 [E]	4
Phe-Seph	3 [C]	2 [C]	2[*]	2 [E]	4
DEAF-Seph	5 [C]	6 [C]	2[**]	2 [E]	4
Butil-Seph. modificada	6 [C]	2 [C]	5 [D]		4

\* Água desionizada

\*\* NaCl 2M

### Resultados

Como o método de purificação em três etapas se baseia em 25 eluição escalonada, ele é facilmente adaptável a operação em grande escala. O

uso de um ligando com alto teor de-ButylSepharose para a etapa (c) resulta em remoção eficiente de impurezas com baixo peso molecular [LMW] que eluem como um grupo na fração não-ligada. O uso do ligando com alto [teor de]-ButylSepharose também resulta em uma melhor relação  $A_{350}/A_{280}$  do que

- 5 o uso da matriz de tipo DEAE para a etapa (c).

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para purificar albumina de soro humano recombinante (rHSA) de uma solução, caracterizado pelo fato de que compreende submeter um sobrenadante de cultura de células (CCS: *Cell Culture Supernatant*) compreendendo rHSA às etapas cromatográficas a seguir:

- (a) troca de cátions em uma matriz bimodal capaz de interagir com rHSA por meio de interação de carga e por meio de ligação de hidrogênio e/ou interação hidrofóbica, e tolerante a um alto teor de sal que resulte em condutividade do CCS superior a 10 mS/cm;
  - (b) cromatografia de interação hidrofóbica (HIC); e
  - (c) troca de ânions;
- em que:
- (I) a condutividade do CCS é entre 10 e 30 mS/cm;
  - (II) o CCS recebe tratamento com calor antes da etapa (b) na presença de um agente de redução;
  - (III) a etapa (b) utiliza uma matriz de HIC compreendendo fenila, ligandos alifáticos e/ou heterocíclicos;
  - (IV) a quantidade de matriz de troca de cátions usada na etapa (a) é metade da quantidade de matriz de HIC usada na etapa (b);
  - (V) a etapa (c) é uma etapa de troca de ânions fracos;
  - (VI) a densidade de ligando do trocador de ânions fracos é >50 µmol/ml de gel/matriz, de preferência >100 µmol/ml de gel/matriz e, o mais preferível, é de 160 µmol/ml de gel/matriz;
  - (VII) o rHSA purificado é recuperado apenas da fração ligada da etapa (c).

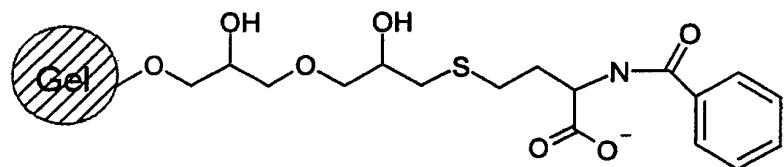
**FIG.1**

Fig. 1A. Trocador de cátion ilustrativo, de tipo HSL

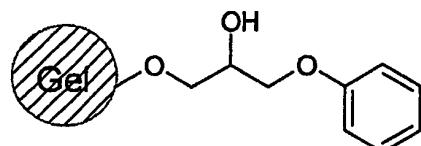


Fig. 1B. Matriz de HIC ilustrativa

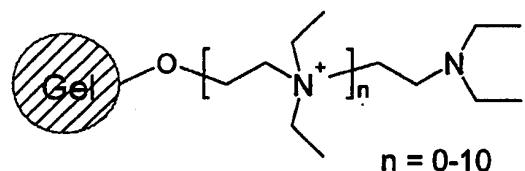


Fig. 1C. Trocador de ânion ilustrativo

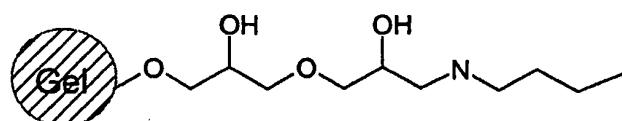
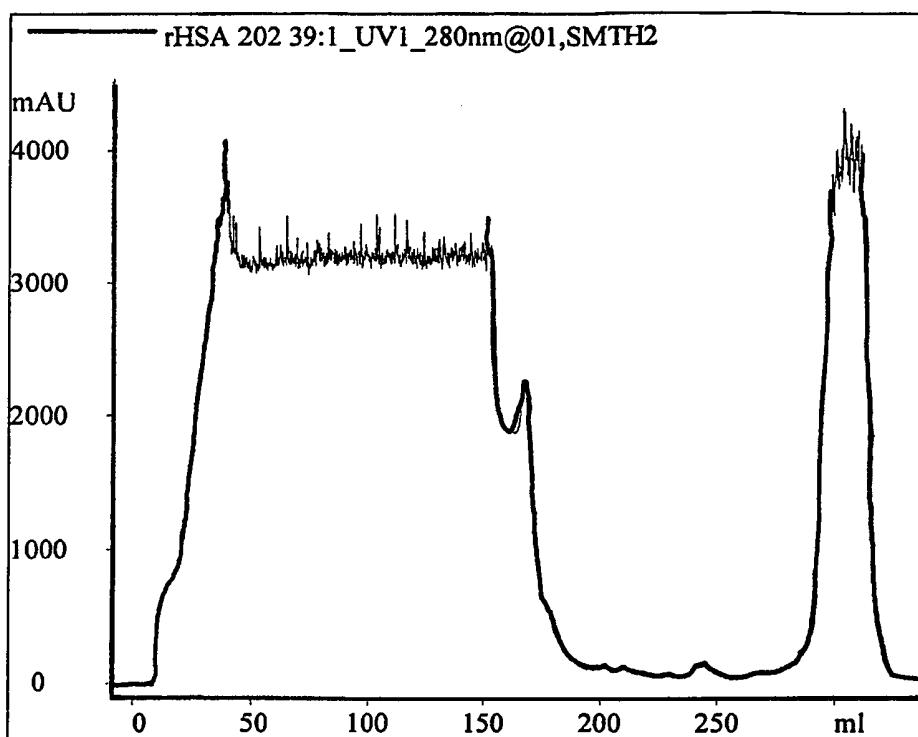
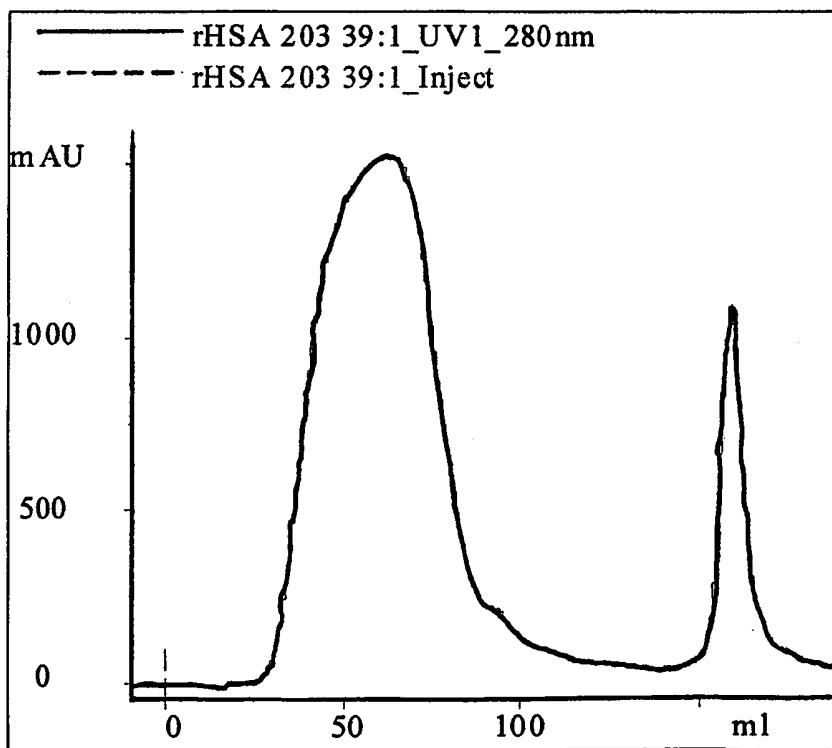
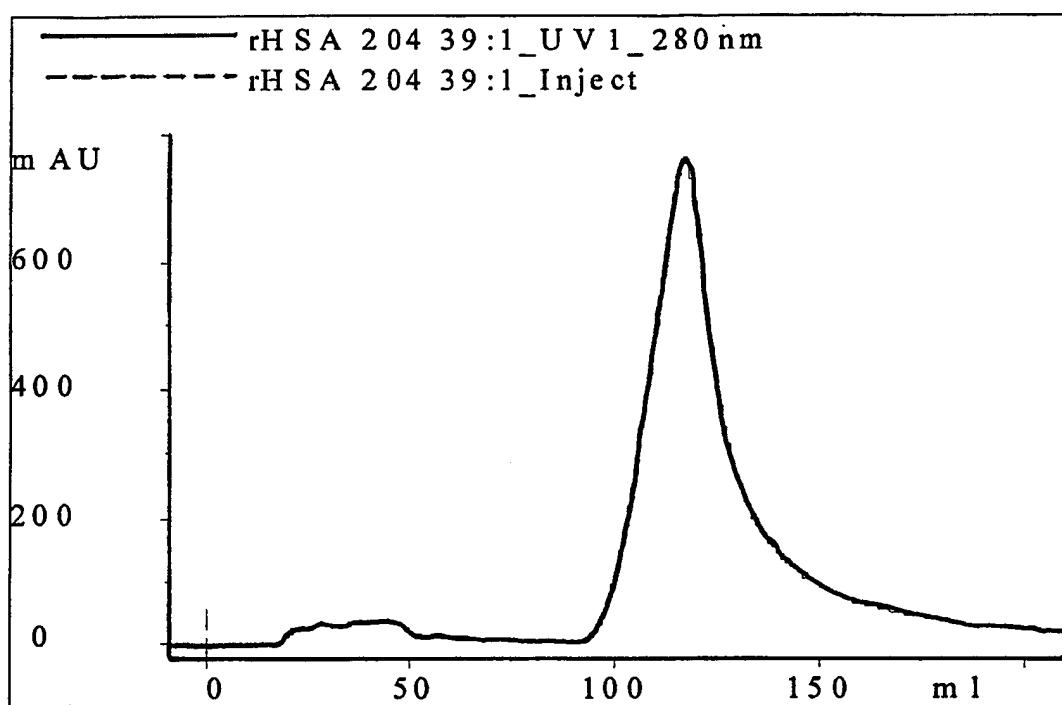


Fig. 1D. Trocador de ânion ilustrativo (Butyl Sepharose<sup>TM</sup>)

**FIG.2****FIG.3**

**FIG.4**

# FIG.5

A: PAGE nativo/Prata; B: SDS PAGE/Prata; C: SDS PAGE/Coomassie BB

