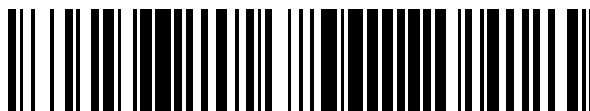


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 827**

51 Int. Cl.:

C07K 14/475 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

C07K 14/535 (2006.01)

C07K 14/575 (2006.01)

B01D 15/36 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2011** **E 16156518 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018** **EP 3040346**

54 Título: **Proceso para la purificación del factor estimulador de colonias de granulocitos, G-CSF**

30 Prioridad:

30.03.2010 EP 10158522

16.04.2010 US 282894 P

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

01.06.2018

73 Titular/es:

OCTAPHARMA AG (100.0%)

Seidenstrasse 2

8853 Lachen, CH

72 Inventor/es:

WINGE, STEFAN;

GILLJAM, GUSTAV y

TIEMEYER, MAYA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 670 827 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

Proceso para la purificación del factor estimulador de colonias de granulocitos, G-CSF

5 La presente invención se refiere a un proceso de purificación de factor estimulador de colonias de granulocitos humano recombinante (rhG-CSF) empleando cromatografía.

10 La purificación de proteínas a partir de fuentes de origen natural es un desafío ya que la proteína de interés a menudo solo está presente en pequeñas cantidades y está acompañada de otros biopolímeros como lípidos, proteínas o incluso fragmentos de células. Además, las proteínas de interés están mayoritariamente asociadas con una función biológica, que a menudo se pierde durante los pasos del proceso para su purificación.

15 El arsenal de métodos para purificar biopolímeros como proteínas es muy extenso. Además de los métodos de precipitación, se conocen métodos cromatográficos en varios tipos de materiales. Con frecuencia los materiales se modifican con enlaces químicos tales como iones orgánicos, cationes como aminas protonadas o aminas parcialmente o completamente alquiladas. Dichos materiales se usan como intercambiadores de aniones. Pero también se pueden usar intercambiadores de cationes para métodos de purificación que dependen de las propiedades físicas de la proteína de interés, tales como la forma, el peso molecular y, en particular, su carga. Se emplea cromatografía de afinidad como alternativa o en combinación.

20 Es conocido en la técnica anterior que una desventaja con las resinas de cromatografía de intercambio iónico tradicionales (como por ejemplo las resinas de cromatografía de intercambio iónico SP-, CM-, Q- o DEAE Sepharose® FF) es que la unión de una proteína a la resina solo puede ser realizado dentro de una concentración relativamente baja de sal (conductividad, osmolaridad, etc.), típicamente en el rango de concentración de 0,01-0,15M de sal (NaCl, etc.). En ciertas aplicaciones, habría una demanda para poder usar las condiciones de purificación relativamente suaves que una etapa de cromatografía de intercambio iónico ejerce hacia las proteínas, también directamente (sin dilución adicional) a una resina de cromatografía con una fuerza iónica algo incrementada. Una mayor fuerza iónica puede ser una ventaja significativa para la estabilidad de la proteína en una solución de proteína; especialmente en una preparación de proteína bruta como en la recogida de productos proteínicos producidos de forma recombinante o en productos derivados de plasma en los que las proteasas potenciales están presentes en la solución que pueden afectar negativamente a la proteína diana. Las proteasas a menudo funcionan mejor en condiciones fisiológicas (como es el caso en la mayoría de los sistemas celulares), es decir, aproximadamente a pH 7 y una concentración de sal de aproximadamente 0,15 M.

35 Las proteasas podrían inhibirse cambiando las condiciones de tratamiento, por ejemplo, por adición de sal y/o cambio de pH, sin embargo, estos dos parámetros son críticos para la realización de una etapa de cromatografía iónica convencional y, por lo tanto, a menudo son imposibles de usar en combinación. Existe la necesidad de proporcionar un método de purificación en el curso del cual se puedan emplear las condiciones para minimizar los efectos de las proteasas.

40 El documento WO-A2-2008/073620 describe un método de fabricación para polipéptidos que se producen en células de insecto utilizando un sistema de expresión de baculovirus. En un ejemplo, el cultivo de células de insectos se complementa con una mezcla de lípidos inmediatamente antes de la infección (por ejemplo, una hora antes de la infección). Los polipéptidos se aíslan del cultivo de células de insecto usando un método que emplea cromatografía de intercambio aniónico o de modo mixto al principio del proceso de purificación. Esta etapa del procedimiento es útil para eliminar las endoglicanasas y proteasas derivadas de células de insectos y, por lo tanto, reduce la pérdida del polipéptido deseado debido a la degradación enzimática. En otro ejemplo, la cromatografía en modo mixto se combina con cromatografía de afinidad de colorante-ligando en una manera de flujo continuo para permitir el procesamiento rápido del líquido de cultivo de células de insecto y la captura del polipéptido. En otro ejemplo más, se aísla un polipéptido a partir de un líquido de cultivo de células de insecto usando un proceso que combina filtración de fibra hueca, cromatografía en modo mixto y afinidad de ligando de colorante en una sola unidad operativa que produce una solución polipeptídica esencialmente libre de actividad endoglucanasa y proteolítica. En un ejemplo adicional, los polipéptidos aislados son glicopéptidos que tienen un patrón de glicosilación específico de insecto, que están conjugados opcionalmente con un grupo modificador, tal como un polímero (por ejemplo, PEG) que usa una glicosiltransferasa y un azúcar de nucleótido modificado. El documento WO-A2-2009/063069 describe un proceso para purificar péptidos, en particular, pero no exclusivamente, a un proceso para eliminar endotoxinas de una solución peptídica, un kit que comprende reactivos para dicho proceso y el péptido purificado obtenido mediante dicho proceso.

60 Dasari Venkata Krishna Rao et al. (Biotechnol Appl Biochem. 2008 Jun; 50 (Pt 2): 77-87) describe un método de purificación que emplea una estrategia de control del proceso desarrollada para mejorar el rendimiento de rhG-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos recombinante humano). En el presente estudio se logró una pureza de $\geq 99\%$ con un rendimiento total de 2,18 g/l. El análisis del producto durante la purificación indicó que los detergentes eliminaban el 72% de LPS (lipopolisacáridos) y el 98% de HCP (proteínas de células huésped) sin eliminar el ácido nucleico. La concentración de cisteína fue un parámetro clave en el repliegamiento de proteínas.

Se evaluó la altura del lecho y el valor de HETP (placas teóricas equivalentes de altura) en la columna SEC (cromatografía de exclusión de tamaño) y se estudió su impacto en la resolución. Se descubrió que la formulación durante SEC era crucial para aumentar los rendimientos del producto con ahorro de tiempo y de costos del proceso.

Quan Bai et al. (Biotechnol Prog. 2007 Sep-Oct; 23 (5): 1138-42) estudia la renaturalización y purificación del factor de estimulación de colonias de granulocitos macrófagos recombinante humano (rhGM-CSF) expresado en *Escherichia coli* con cromatografía de intercambio aniónico fuerte (SAX). Se investigaron los efectos de los valores de pH, las relaciones de concentraciones de GSH/GSSG y las concentraciones de urea en la fase móvil en la renaturalización y purificación de rhGM-CSF con SAX, respectivamente. Los resultados muestran que los tres factores anteriores tienen influencias notables sobre la eficacia de la renaturalización y la recuperación de masa de rhGM-CSF. La adición de GSH/GSSG en la fase móvil puede mejorar la formación de enlaces disulfuro correctos en rhGM-CSF de modo que su rendimiento de renaturalización aumenta. Además, para mejorar la recuperación de masa de rhGM-CSF con SAX, se añadió la baja concentración de urea en la fase móvil para prevenir la agregación de proteínas desnaturalizadas. En las condiciones óptimas, el rhGM-CSF se renaturalizó con purificación simultánea en la columna SAX en 30 minutos solo en un paso.

Shelly A. Pizarro (Protein Expr. Purif. 2010 Aug; 72 (2): 184-93) describe sobre un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF165) que es un mitógeno potente que induce la angiogénesis y la permeabilidad vascular in vivo y ha demostrado potencial en aplicaciones terapéuticas para acelerar la curación de heridas. El proceso descrito en este informe involucra un sistema de expresión bacteriano capaz de producir aproximadamente 9 g de rhVEGF por litro de cultivo y un proceso de purificación descendiente de replegamiento de proteínas y tres pasos de cromatografía antes de la formulación de la sustancia del fármaco. Se usó un proceso de fermentación de alta densidad celular (HCD) por lotes para producir rhVEGF en cuerpos de inclusión periplásmicos. Los cuerpos de inclusión se recogen del lisado celular y se someten a una operación de solubilización y replegamiento de proteínas en un solo paso para extraer el rhVEGF para la purificación. Los rendimientos de recuperación globales observados durante el proceso, incluidos el replegamiento y la cromatografía, fueron de $30 \pm 6\%$. Las impurezas de las células huésped se eliminan sistemáticamente por debajo de los niveles objetivo tanto en el laboratorio como a gran escala en la demostración de la solidez del proceso. La estructura del rhVEGF replegado y purificado se confirmó por espectrometría de masas. La secuenciación N-terminal y el mapeo de péptidos tripticos así como las variantes del producto se analizaron mediante múltiples ensayos de HPLC.

Kimberly A. Kaleas (J Chromatogr A. 2010 Jan 8; 1217 (2): 235-42) describe que las resinas de cromatografía en modo mixto están ganando popularidad como herramientas de purificación para materias primas, y describe el desarrollo de una aplicación industrial para capturar selectivamente el factor de crecimiento endotelial vascular humano recombinante (rhVEGF) sobre Capto MMC™ a partir de una materia prima alcalina. La resina Capto MMC™ contiene un ligando que tiene el potencial de participar en interacciones iónicas, hidrofóbicas e hidrogénicas con proteínas y está acoplado a una matriz de cuentas de agarosa altamente reticulada. El VEGF es un factor clave de crecimiento implicado en la angiogénesis y tiene aplicaciones terapéuticas para la cicatrización de heridas. Se expresa en *Escherichia coli* como cuerpos de inclusión. Los sólidos se recogen del lisado celular, y el rhVEGF se solubiliza y se replega a pH 9,8 en presencia de urea y agentes redox. Las características exclusivas del modo mixto de Capto MMC™ permitieron la captura de esta proteína básica con un mínimo acondicionamiento de la carga y proporcionó un grupo concentrado para posterior procesamiento con > 95% de rendimiento mientras redujeron el contenido de proteína de la célula huésped a <1,2%. Este estudio explora el impacto de las condiciones de carga y el tiempo de residencia en la capacidad de unión dinámica, así como el desarrollo de condiciones de elución para un rendimiento de purificación óptimo. Después de evaluar diversos tampones de elución, se demostró que L-arginina HCl es un agente eluyente efectivo para la desorción de rhVEGF a partir de la resina de modo mixto Capto MMC™, ya que rompe con éxito las interacciones múltiples entre la resina y rhVEGF. El escalado de laboratorio produjo un paso de cromatografía robusto que se implementó con éxito en la escala de fabricación comercial.

El documento CN 101 260 145 A describe un proceso de aislamiento y purificación de proteínas diana que incluye albúmina sérica humana recombinante y proteínas de fusión de las mismas que emplean la resina de modo mixto Capto MMC™.

El documento WO-A1-2009/156430 describe un proceso de purificación del factor VIII de coagulación usando cromatografía multimodal así como también una composición que comprende FVIII recombinante purificado obtenible mediante dicho proceso.

Un objeto de la invención fue evitar los inconvenientes de los procesos de purificación de una proteína del factor de crecimiento de la técnica anterior proporcionando un nuevo proceso. De acuerdo con la invención, el objetivo se logra mediante un proceso de purificación de factor estimulador de colonias de granulocitos humanos recombinante (rhG-CSF) en una secuencia de purificación empleando cromatografía, que se caracteriza porque

- al menos una cromatografía se realiza usando resina Capto MMC™,

- rhG-CSF se une a la resina Capto MMC a un pH entre 4 y 6, y

- el rhG-CSF se eluye a un pH de 5,5 a 6,5 y en el que la elución se realiza con arginina que tiene una concentración en el intervalo de 0,1 M a 2,0 M,

- opcionalmente en combinación con una etapa de cromatografía de afinidad por ligando que emplea un fragmento Fab derivado de levadura dirigido contra el rhG-CSF.

La invención proporciona un proceso en el que ventajosamente se pueden minimizar los efectos de las proteasas. Posibilitando agregar sal y/o cambiar el pH en la muestra de proteína bruta con proteasas potenciales presentes, lo que podría degradar el rhG-CSF, y procesar la solución de proteína sin más medidas adicionales y unir rhG-CSF a la resina de cromatografía Capto MMC™ y proporcionando así un paso optimizado para la concentración y purificación de rhG-CSF en una muestra bruta, haciéndolo adecuado para una posterior purificación usando una cromatografía de afinidad por ligando específica dirigida hacia rhG-CSF, con proteasa reducida y/o contenido de ADN durante el procesamiento posterior. Es de importancia específica, para evitar la degradación de rhG-CSF durante la purificación, utilizar la cromatografía Capto MMC™ como una etapa de captura en una solución de proteína bruta.

En una realización, la cromatografía en Capto MMC™ se combina con una etapa de cromatografía de afinidad por ligando que emplea un fragmento Fab derivado de levadura dirigido contra el rhG-CSF. La etapa cromatográfica que emplea el fragmento F_{ab} derivado de levadura dirigido contra el rhG-CSF es especialmente adecuada para la purificación de rhG-CSF con alto rendimiento y una integridad de molécula inalterada (degradación, etc.).

G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos) es un miembro de las glicoproteínas reguladoras hemopoyéticas, que participan en el crecimiento y la diferenciación de las células hemopoyéticas de las células madre. rhG-CSF muestra una IP ≤6. La resina Capto MMC™ comprende restos unidos a una matriz y los restos pueden interactuar con rhG-CSF en una mezcla mediante interacciones iónicas y otros tipos de interacciones tales como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y tiofílicas. En una realización adicional de la invención, la etapa de resina Capto MMC™ se procesa para capturar rhG-CSF de una solución de proteína bruta donde después del procesamiento el eluido de cromatografía Capto MMC™ resultante se transfiere a la etapa de cromatografía de afinidad por ligando empleando un fragmento F_{ab} derivado de levadura dirigido contra rhG-CSF y después de la elución de rhG-CSF de dicha etapa de cromatografía de afinidad, proporcionando una pureza de más de aproximadamente el 90% en relación con las proteínas y el ADN.

En otra realización adicional de la invención, la etapa de resina Capto MMC™ y la etapa de cromatografía de afinidad por ligando que emplea un fragmento F_{ab} derivado de levadura dirigido contra rhG-CSF se combinan con otras etapas de purificación cromatográfica para proporcionar una pureza de más más del 99% en el producto final de rhG-CSF.

En otra realización más de la invención, la mezcla que comprende el rhG-CSF es una solución.

En otra realización adicional de la invención, el rhG-CSF está en una solución de proteína bruta que incluye proteasas potenciales, que pueden degradar el producto.

En una realización adicional de la invención, la elución se realiza con arginina, es decir, con un aminoácido que tiene una cadena lateral básica. La elución también se puede realizar en combinación con un cambio de pH. El cambio de pH se realiza ajustando el pH del tampón de elución con, por ejemplo, hidróxido sódico o ácido acético al pH deseado y después aplicando el tampón a la resina Capto MMC™.

De acuerdo con la invención, la concentración de arginina está en particular en el intervalo de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 2 M. En una realización adicional de la invención, se usa una sustancia tampón que comprende preferiblemente al menos una de las sustancias seleccionadas del grupo que consiste en citrato de sodio, histidina, ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)-etano sulfónico (HEPES), ácido 2-(N-morfolino)etano sulfónico (MES), base Tris y acetato de sodio.

En el procedimiento de la invención, puede estar presente un detergente no iónico en cualquiera de los tampones utilizados, dicho detergente no iónico se selecciona en particular del grupo que consiste en polisorbatos (Polisorbato 20, 40, 60, 80) y Pluronic F68.

En otra realización de la invención, se aplica un tampón de lavado a la resina Capto MMC™, para eliminar contaminantes y retener el rhG-CSF, antes de liberar el rhG-CSF, caracterizado porque el tampón de lavado comprende un aminoácido que tiene una cadena lateral básica y/o una sal elegida de acuerdo con la serie Hofmeister, por ejemplo cloruro de sodio y cloruro de potasio. De acuerdo con la invención, la concentración del cloruro de sodio en el tampón de lavado está en particular en el intervalo de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 2M.

Puede ser ventajoso aplicar el tampón de lavado a la resina Capto MMC™, para eliminar contaminantes (proteasas, ADN, etc.) y retener el rhG-CSF antes de liberar el rhG-CSF.

En el tampón de elución, la cantidad de arginina está típicamente en el rango de 0,1 a 2M, en particular 0,5M.

La cantidad de detergente no iónico está típicamente en el intervalo de 0,001 a 1%, en particular en los tampones para cromatografía Capto MMC™ al 0,02%.

La resina de cromatografía Capto MMC™ que puede emplearse de acuerdo con la invención contiene un ligando de ácido 2-(benzoilamino) butanoico con carga negativa y es Capto MMC™.

En otra realización de la presente invención, la secuencia de purificación puede comprender etapas de eliminación/inactivación de patógenos que comprenden una etapa de inactivación química, una etapa de eliminación basada en tamaño, etapas de cromatografía o combinaciones de las mismas, cuyos pasos se basan en diferentes propiedades fisiológicas dirigidas al patógeno a ser eliminado.

En una realización particular, el proceso de la invención, la secuencia de purificación comprende además los siguientes pasos:

1. cromatografía Capto MMC™;
2. una etapa de inactivación química para virus con cubierta, en particular la inactivación disolvente/detergente empleando fosfato de tri-n-butilo y Triton X-100 como se describe en el documento EP-A-131 740;
3. una resina de afinidad basada en un fragmento F_{ab} dirigido contra rhG-CSF expresado en levadura;
4. un intercambiador de cationes tal como SP Sepharose® o Resource™ S;
5. una etapa de eliminación de patógenos por filtración con un tamaño medio de poro de aproximadamente 20 nm tal como Planova 20N;
6. una etapa de intercambio y/o concentración de tampón tal como ultrafiltración con un corte aproximado de 1-5 kDa;
7. una resina de cromatografía de exclusión por tamaño tal como Superdex® 75.

Breve descripción de las figuras.

La Figura 1 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 4,0 utilizando un tampón de acetato de sodio.

La Figura 2 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 4,0 utilizando un tampón de acetato de sodio.

La Figura 3 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 4,0 utilizando un tampón de acetato de sodio.

La Figura 4 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 4,0 del material de partida utilizando un tampón de acetato de sodio.

La Figura 5 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 4,0 utilizando un tampón de citrato de sodio.

La Figura 6 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 5,0 utilizando un tampón de citrato de sodio.

La Figura 7 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 5,5 utilizando un tampón de citrato de sodio.

La Figura 8 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 6,0 utilizando un tampón de citrato de sodio.

La Figura 9 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 6,5 utilizando un tampón de citrato de sodio.

Las Figuras 10a y 10b muestran una SDS-PAGE teñida con plata y la separación de proteínas en el inicio y eluido de Capto MMC™.

La Figura 11 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF de un sobrenadante libre de células.

La Figura 12 muestra una SDS-PAGE teñida con Coomassie que muestra el eluato después de la etapa de cromatografía de afinidad.

La figura 13 muestra una SDS-PAGE teñida con plata que muestra el material de partida, el Flujo continuo y la elución después de la etapa de cromatografía de afinidad.

La invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes, que se han ejemplificado mediante la purificación de rhG-CSF.

Ejemplos

Descripción de los métodos analíticos

Determinación del contenido de rhG-CSF por ELISA específico de G-CSF

El principio de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es la cuantificación de una proteína (antígeno) mediante su unión específica a anticuerpos contra esta proteína. La cuantificación de rhG-CSF se realizó mediante el uso de un ELISA de tipo sándwich, basado en el ELISA de conjunto doble de G-CSF (R&D Systems, N° Cat. DY214). Como estándar de calibración se usó G-CSF humano recombinante derivado de *E. coli* (R&D Systems, N° Cat. 214-CS-005, 0,015-1 ng/ml). El anticuerpo de captura (G-CSF antihumano de ratón) se unió a los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después de la captura del antígeno de G-CSF y una etapa de lavado, el anticuerpo de detección biotinilado (G-CSF de cabra antihumano) se unió al antígeno de G-CSF. Después de una segunda etapa de lavado, se aplicó estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (estreptavidina-HRP), que se une al anticuerpo de detección biotinilado. Para la cuantificación, se añadió el sustrato de peroxidasa tetrametilbencidina (TMB) en presencia de peróxido de hidrógeno y se desarrolló un color azul. Después de detener la reacción con ácido sulfúrico, se desarrolla un colorante amarillo estable. La concentración de colorante amarillo es proporcional a la cantidad de peroxidasa unida y, por lo tanto, proporcional a la cantidad de antígeno de G-CSF. La concentración del tinte se mide fotométricamente a 450 nm. La concentración de rhG-CSF en las muestras desconocidas se calculó a partir de la curva estándar de G-CSF humana recombinante, que siempre dio un coeficiente de correlación lineal (r) de $> 0,99$.

Determinación del contenido de rhG-CSF por HPLC de fase inversa (RP)

RP-HPLC implica la separación de proteínas en función de su polaridad; la retención de las moléculas de proteína se rige por interacciones hidrofóbicas entre la porción no polar de las moléculas de soluto y la fase estacionaria no polar de la columna de HPLC. Se usó un sistema de HPLC (Dionex Ultimate 3000), equipado con un detector UV y una columna Jupiter C18, 300A, 5 μ m, 4,6 x 150 mm (Phenomenex, N° Cat. 00F-4053-EO) para la determinación de proteínas. La columna, funcionando a 20 ± 5 °C, se equilibró con ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v) (TFA) en agua (fase móvil A). Para la elución, se utilizó TFA al 0,1% (v/v) en acetonitrilo (fase móvil B) en el gradiente lineal (0-5 min 5% B, 5-12 min 55% B, 12-17 min 100% B, 17 -22 min 5% B) con un caudal de 1,0 ml/min. La carga de muestra fue de 30 μ g por inyección en un volumen de inyección total de 100 μ l máximo. La detección se llevó a cabo midiendo la absorbancia UV a 214 nm. Filgrastim CRS de Ph.Eur 2.5-40 μ g (2.5-5-10-20-40 μ g) se usó para la curva estándar. El estándar Filgrastim CRS se prediluyó en agua para uso en laboratorio (WFL) a una concentración de 0,4 mg/ml. Se realizó una predilución de las muestras en WFL hasta una cantidad de inyección de 30 μ g, si fuera necesario. El contenido de rhG-CSF en las muestras desconocidas se calculó a partir de la curva estándar de Filgrastim CRS, que siempre dio un coeficiente de correlación lineal (r) de $> 0,99$.

Determinación de la pureza mediante HPLC de fase inversa (RP)

El método y los dispositivos usados para la determinación de la pureza mediante RP-HPLC son equivalentes al método para la determinación del contenido de rhG-CSF. La pureza de la solución que contiene rhG-CSF [%] se calculó ajustando el área del pico del pico de rhG-CSF en relación con el área del pico total.

Determinación de la pureza y distribución del peso molecular mediante SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) implica la separación de proteínas en función de su tamaño. La determinación de la pureza y el análisis de la distribución del peso molecular para las muestras que contienen rhG-CSF se realizaron en condiciones reductoras. Para este propósito se usaron geles de gradiente de Tris-Tricina (10-20%, de Anamed, N° Cat. TR12012) y geles de gradiente Tris-HCl (10-20%, de Bio-Rad, N° Cat. 345-0043). Para los geles de gradiente de Tris-Tricina, se aplicó el Polipéptido SDS-PAGE de peso molecular estándar de Bio-Rad (N° Cat. 161-0326; 1,4- 26,6 kDa) como patrón de peso molecular; para los geles de gradiente Tris-HCl, se aplicó el estándar de precisión Precision Plus Protein All Blue Standard de Bio-Rad (N° Cat. 161-0373, 10-250 kDa). Las bandas de proteína separadas por electroforesis se visualizan mediante tinción con plata o con Coomassie. El G-CSF humano recombinante derivado de *E. coli* (no glicosilados, R&D Systems N° Cat. 214-CS-005) se usó el producto glicosilado derivado de CHO, llamado Granocyte (Chugai) como referencia de G-CSF (muestras de control). La evaluación del peso molecular y la pureza se realiza visualmente al juzgar las apariencias de los estándares, referencia (muestra de control) y muestras analizadas.

G-CSF humano recombinante (rhG-CSF)

Producción y purificación de suspensión de células que contienen rhG-CSF.

5 Células

La línea celular utilizada es un derivado de la célula renal embrionaria humana 293 (HEK 293), que se adaptó al crecimiento libre de suero. Este huésped, HEK 293F, se transfectó de forma estable con un casete de expresión que portaba la secuencia de codificación de ADNc para G-CSF humano. El promotor fuerte se usó para el casete. El proceso general también se describe en el documento EP 1739179 (Schröder et al).

Método de cultivo

Las células se cultivaron en medio libre de suero en equipamientos generales y de acuerdo con métodos generales bien conocidos en la técnica, por ejemplo, cultivos agitados o agitados en matraces t, matraces agitadores y biorreactores (sistemas desechables y tanques agitados convencionales) se ejecutan como cultivos por lotes, lotes alimentados, cultivos chemostat por perfusión o continuos (Freshney, RI (2000), Culture of animal cells: a manual of Basic technique, 4ª edición, Wiley-Liss; Spier, RE ed (2000), Encyclopedia of cell technology, Wiley, Nueva York; Enfors, S-O y Haggström, L (2000), Bioprocess technology: fundamentals and applications, Högskoletryckeriet, Royal Institute of Technology, Estocolmo; Vinci, VA y Parekh, SR (2003), Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial, and plant cells, Humana Press, USA). Típicamente, la perfusión de medio se usó para aumentar el número de células y los títulos de rhG-CSF más allá de los niveles de cultivo por lotes estándar. El rendimiento de rhG-CSF y la cantidad de proteínas de la célula huésped difieren dependiendo del modo de cultivo:

- el título de rhG-CSF típicamente aumentará con el número de células
- el contenido de proteína total y el contenido de ADN aumentarán típicamente con el número de células
- el contenido de proteína total y el contenido de ADN también puede aumentar con la longevidad del cultivo
- los cultivos por lotes acumulan proteína y ADN; nada se agrega externamente, no se elimina nada
- los procesos de perfusión enjuagan los cultivos celulares de los metabolitos, proteínas, ADN y otras impurezas, los filtros o las centrifugas celulares se usaban típicamente para la retención celular.

El rhG-CSF se libera de las células y la suspensión celular o el sobrenadante de la suspensión celular se recoge. Las propiedades de la cosecha (titulaciones de rhG-CSF e impurezas como se mencionó anteriormente) difieren según el modo de cultivo utilizado.

La suspensión celular se ha usado en algunos de los ejemplos de rhG-CSF descritos a continuación.

Método de purificación

El rhG-CSF se libera de las células y la suspensión celular o el sobrenadante de la suspensión celular se recogen. La purificación aplicada comprende una purificación en 4 pasos. Se usó cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose® Fast Flow (FF)) para la etapa de captura de rhG-CSF del sobrenadante del cultivo celular, seguido de una etapa de cromatografía de afinidad metálica de metal inmovilizado (IMAC) (Zn-IDA quelante Sepharose® Fast Flow (FF)), una segunda etapa de cromatografía de intercambio catiónico (Resource™ S) para pulir y una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex® 75) como paso final.

Preparación de rhG-CSF contenido en el sobrenadante de cultivo celular

Antes de la etapa de captura, la concentración de rhG-CSF de los lotes de sobrenadantes [mg/L] se determinó mediante un ELISA específico de G-CSF para verificar la cantidad total de rhG-CSF [mg]. El sobrenadante congelado (-80 ° C) se descongeló en un baño de agua ajustado a 20 ± 5 ° C. Después, el sobrenadante se centrifugó a 9000xg durante 15 minutos a 4 ° C y luego se filtró adicionalmente usando unidades de filtro de 0,2 µg. El pH del sobrenadante filtrado se ajustó a pH 4,0 usando ácido acético.

Etapas de captura (SP Sepharose® FF)

Una columna XK 16/20 se empaquetó con 10 ml de material SP Sepharose® FF (1 volumen de columna (CV) = 10 ml). La resina SP Sepharose® FF se obtuvo de GE Healthcare (Nº Cat. 17-0729-01).

El equilibrado se realizó con 3 CV del tampón de equilibrado (acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM, Tween20 al 0,02%, pH 4,0) seguido de la carga del material de partida con un caudal de 2,5 ml/min. El siguiente paso de lavado se realizó con el mismo tampón y la misma velocidad de flujo, usando 5 CV. La elución se realizó con un tampón de elución que contenía 20 mM de acetato de sodio, 1 M de cloruro de sodio, 0,02% de Tween20, pH 4,0, aplicando un gradiente lineal de 0% a 40% de tampón de elución en 8 CV a un caudal de 2,5 ml/min, seguido de un paso de elución con 100% de tampón de elución con 5 CV.

La concentración de rhG-CSF del conjunto de eluato, recogida a partir de la elución de gradiente lineal, se analizó mediante un ELISA específico de G-CSF.

Paso IMAC (Zn-IDA Sepharose® FF quelante)

Una columna XK 16/20 se empaqueta con 10 ml de Sepharose® FF quelante que se carga con 2 ml de ZnCl_2 0,2 M (1 volumen de columna (CV) = 10 ml). La resina Sepharose® FF quelante se obtuvo de GE Healthcare (Nº Cat 17-0575-01). Antes de cargar, el pH de la carga de la columna IMAC (eluido de SP Sepharose® FF) se ajustó a pH 8,0 con NaOH).

El equilibrado se realizó con 3 CV del tampón de equilibrado (Tris/HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) seguido de la carga del eluido de SP Sepharose® FF con un caudal de 2 ml/min. El siguiente paso de lavado se realizó con el mismo tampón y la misma velocidad de flujo, usando 2 CV.

La elución se realizó con un tampón de elución que contenía Tris/HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 4,0, aplicando un gradiente lineal de 0% a 100% de tampón de elución dentro de 3 CV a un caudal de 1 ml/min. A continuación, se aplicó un retraso de gradiente con tampón de elución del 100% con 4 CV.

La concentración de rhG-CSF del conjunto de eluato, recogida a partir de la elución con tampón de elución al 100%, se analizó mediante un ELISA específico de G-CSF.

Paso de pulido (Resource™ S)

Una columna Resource™ S preempaquetada (CV = 6 ml) de la columna GE Healthcare (Nº Cat. 17-1180-01) se equilibra con un tampón de equilibrado de 5 CV (acetato de sodio 20 mM, Tween-20 al 0,02%, pH 4,0) a un caudal de 4 ml/min. Antes de la purificación, el eluato de IMAC debe ajustarse a un pH de 4,0 con ácido acético y diluirse 5 veces usando el tampón de equilibrado.

La etapa de lavado se realizó con 10 CV del tampón de equilibrado a un caudal de 4 ml/min.

La elución se realizó con un tampón de elución que contiene 20 mM de acetato de sodio, 1 M de NaCl, 0,02% de Tween-20, pH 4,0, aplicando un gradiente lineal de 0% a 100% de tampón de elución con 20 CV a un caudal de 2 ml/min.

La concentración de rhG-CSF del conjunto de eluato, recogida a partir de la elución de gradiente lineal con 50-85% de tampón de elución, se analizó mediante un ELISA específico para G-CSF.

Paso de cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex75)

Para la etapa de exclusión de tamaño se usó una columna Hiloal 26/60 Superdex 75 Prep Grade preempaquetada (GE Healthcare Nº Cat 17-1044-01, CV = 320 ml). La columna se equilibró con 1 tampón CV (acetato de sodio 20 mM, NaCl 200 mM, Tween20 al 0,02%, pH 6,5) seguido de la carga del eluato Resource™ S a un caudal de 2,5 ml/min y un volumen de carga máximo de 4 % CV.

La concentración de rhG-CSF del conjunto de eluato se analizó mediante un ELISA específico de G-CSF y mediante HPLC de fase reversa (RP). La pureza de la fracción de purificación final se analiza mediante el uso de RP-HPLC, HPLC de exclusión por tamaño (SE) y SDS-PAGE y es típicamente > 95%.

El eluato de exclusión por tamaño se ha usado en algunos de los ejemplos de rhG-CSF descritos a continuación.

Purificación de rhG-CSF usando resina Capto MMC™ como etapa de captura.

Ejemplo de referencia 1 (Experimento 1)

Material de partida

El rhG-CSF purificado se diluyó en un tampón de equilibrado para disminuir la concentración de proteína total y para conseguir un volumen más conveniente antes de cargarse en una columna Capto MMC™. El rhG-CSF estaba disuelto antes de la dilución en acetato de sodio 20 mM de, NaCl 0,5M, Tween 20 0,02%, pH 4,0.

Resina y columna cromatográficas

Se usó Capto MMC™, una resina en modo mixto de GE Healthcare (n.º de cat. 17-5317), como etapa de captura para la molécula de rhG-CSF. Capto MMC™ es una resina catiónica débil con interacciones hidrofóbicas y tiofílicas y

enlaces de hidrógeno. Una columna Tricorn 5/150 (GE Healthcare) se empaquetó con resina Capto MMC™ a una altura de lecho de 15 cm. El volumen de columna (CV) de Capto MMC™ fue de 3 ml.

Tampones

Tampón de equilibrado: acetato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 4,0

Tampón de elución: citrato sódico 20 mM, NaCl 0,1 M, monoclóhidrato de arginina 0,5 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 7,0.

Configuración experimental

La columna se equilibró con tampón de equilibrado seguido de carga del material de partida a un caudal de 1 ml/min. Esto fue seguido por una etapa de lavado con el tampón de equilibrado y luego se eluyó la columna usando el tampón de elución. Las muestras se retiraron y se analizaron para rhG-CSF mediante un método de HPLC. Como se ve en la Tabla 1, no se encontró G-CSF en la fracción de flujo a través. El tampón de elución contenía clorhidrato de arginina 0,5 M y el pH se alteró a 7,0. La recuperación de G-CSF fue del 89% y el perfil de elución fue un pico más concentrado. La columna se limpió después de la elución en su lugar con una solución de NaOH 1M. Se observó un pico muy pequeño a partir del lavado con NaOH 1M de la columna.

El cromatograma se muestra en la figura 1.

Tabla 1.

Muestra	Volumen ml	rhG-CSF µg/ml	Total rhG-CSF µg	Rendimiento%
Material de partida	8,71	111	966,8 100	
Flujo continuo y lavado de equil.	18	0	0	0
Eluato	12	72	864	89

Conclusión

Todos los G-CSF cargados se unieron a Capto MMC™ a pH 4,0. Se obtuvo un alto rendimiento (89%) en la fracción de elución que se recolectó en tres volúmenes de columna. El tampón de elución tenía un pH de 7,0 y se incluyó monoclóhidrato de arginina 0,5M.

Leyenda de figura de la Figura 1.

Experimento 1; Un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 4,0 utilizando un tampón de acetato de sodio. La absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) medida se presentan en la figura. La columna se eluyó usando un tampón con pH 7,0 que contenía monoclóhidrato de arginina 0,5M. Se obtuvo un doble pico por elución. El doble pico se recogió como una fracción.

Ejemplo de referencia 2 (Experimento 2)

Material de partida

El rhG-CSF purificado se diluyó en un tampón de equilibrado para disminuir la concentración de proteína total y para conseguir un volumen más conveniente antes de cargarse en una columna Capto MMC™. El rhG-CSF estaba disuelto antes de la dilución en acetato de sodio 20 mM, NaCl 0,5M, Tween 20 0,02%, pH 4,0.

Resina y columna cromatográficas

Se usó Capto MMC™, una resina de modo mixto de GE Healthcare (n. ° de cat. 17-5317), como etapa de captura para la molécula de rhG-CSF. Capto MMC™ es una resina catiónica débil con interacciones hidrofóbicas y tiofílicas y enlaces de hidrógeno. Una columna Tricorn 5/150 (GE Healthcare) se empaquetó con resina Capto MMC™ a una altura de lecho de 15 cm. El volumen de columna (CV) de Capto MMC™ fue de 3 ml.

Tampones

Tampón de equilibrado: acetato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 4,0

Tampón de elución: citrato sódico 20 mM, NaCl 0,1 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 7,0.

Configuración experimental

La columna se equilibró con tampón de equilibrado seguido de la carga del material de partida a un caudal de 1 ml/min. Esto fue seguido por una etapa de lavado con el tampón de equilibrado y luego se eluyó la columna usando el tampón de elución. Las muestras se retiraron y se analizaron para rhG-CSF mediante un método de HPLC. Como se ve en la Tabla 2, no se encontró rhG-CSF en el flujo. El tampón de elución tenía un pH de 7,0. Se encontró más del 90% del rhG-CSF cargado en la columna Capto MMC™ en la fracción eluida. El pico de elución fue más amplio que en el experimento 1, cuando se incluyó arginina en el tampón de elución. El volumen de elución se duplicó.

Tabla 2.

Muestra	Volumen ml	rhG-CSF µg/ml	Total rhG-CSF µg	Rendimiento%
Material de partida	8,91	77,47	691	100
Flujo continuo y lavado de equil.	30	0	0	0
Eluato	24	26,07	626	90,5

Conclusión

El G-CSF humano recombinante (rhG-CSF) se une a la resina Capto MMC™ a pH 4 y podría eluirse a pH 7 en una solución tamponada con citrato de sodio.

Ejemplo de referencia 3 (Experimento 3)

Material de partida

El rhG-CSF purificado se diluyó en un tampón de equilibrado para disminuir la concentración de proteína total y para conseguir un volumen más conveniente antes de cargarse en una columna Capto MMC™. El rhG-CSF estaba disuelto antes de la disolución en 20 mM de acetato de sodio, NaCl 0,5M, Tween 20 0,02%, pH 4,0.

Resina y columna cromatográficas

Se usó Capto MMC™, una resina en modo mixto de GE Healthcare (n.º de cat. 17-5317), como etapa de captura para la molécula de rhG-CSF. Capto MMC™ es una resina catiónica débil con interacciones hidrofóbicas y tiofílicas y enlaces de hidrógeno. Una columna Tricorn 5/150 (GE Healthcare) se empaquetó con resina Capto MMC™ a una altura de lecho de 15 cm. El volumen de columna (CV) de Capto MMC™ fue de 3 ml.

Tampones

Tampón de equilibrado: acetato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 4,0

Tampón de elución: HEPES 20 mM, NaCl 0,3 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 7,0.

Configuración experimental

La columna se equilibró con tampón de equilibrado seguido de la carga de material de partida a un caudal de 1 ml/min. Esto fue seguido por una etapa de lavado con el tampón de equilibrado y luego se eluyó la columna usando el tampón de elución. Las muestras se retiraron y se analizaron para rhG-CSF mediante un método de HPLC. Como se ve en la Tabla 3, no se encontró rhG-CSF en el flujo continuo. El tampón de elución tenía un pH de 7,0 y la concentración de NaCl se elevó a 0,3 M en comparación con el experimento 2. Se encontró que todo el rhG-CSF cargado en la columna Capto MMC™ estaba en la fracción eluida. El perfil de cromatografía se muestra en la figura 2. Se obtuvo un pico de elución amplio, y el pico de elución completo se recogió como una fracción de elución.

Tabla 3.

Muestra	Volumen ml	rhG-CSF µg/ml	Total rhG-CSF µg	Rendimiento%
Material de partida	8,8	71,2	627	100
Flujo continuo y lavado de equil.	30	0	0	0
Eluato	24	27,1	650	103,7

Conclusión

El rhG-CSF se une a la resina Capto MMC™ a pH 7 y se eluyó al 100% a pH 7 cuando se incluyó NaCl 0,3 M en el tampón de elución. El volumen de elución fue grande, el doble del volumen en comparación si se incluyese arginina en el tampón de elución. Esto significa que NaCl 0,3M no tiene el mismo efecto de elución en G-CSF de una resina Capto MMC™ con arginina 0,5M.

Leyenda de figura de la Figura 2.

Experimento 3; Un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 4,0 utilizando un tampón de acetato de sodio. La absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) medida se presentan en la figura. La columna se eluyó usando un tampón con pH 7,0 que contenía NaCl 0,3M. Se obtuvo un doble pico por elución. El doble pico amplio se recogió como una fracción.

Ejemplo de referencia 4 (Experimento 4)

Material de partida

El rhG-CSF purificado se diluyó en un tampón de equilibrado para disminuir la concentración de proteína total y para conseguir un volumen más conveniente antes de cargarse en una columna Capto MMC™. El rhG-CSF estaba disuelto antes de la dilución en acetato de sodio 20 mM, NaCl 0,5M, Tween 20 0,02%, pH 4,0.

Resina y columna cromatográficas

Se usó Capto MMC™, una resina de modo mixto de GE Healthcare (n. ° de cat. 17-5317), como etapa de captura para la molécula de rhG-CSF. Capto MMC™ es una resina catiónica débil con interacciones hidrofóbicas y tiofílicas y enlaces de hidrógeno. Una columna Tricorn 5/150 (GE Healthcare) se empaquetó con resina Capto MMC™ a una altura de lecho de 15 cm. El volumen de la columna (CV) fue de 3 ml.

Tampones

Tampón de equilibrado: acetato sódico 20 mM, NaCl 0,1 M, polisorbato 80 al 0,02%, a pH 4,0
Tampón de elución: citrato de sodio 20 mM, clorhidrato de arginina 0,5 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 4,0.

Configuración experimental

La columna se equilibró con tampón de equilibrado seguido de cargar el material de partida a un caudal de 1 ml/min. Esto fue seguido por una etapa de lavado con el tampón de equilibrado y luego se eluyó la columna usando el tampón de elución. Las muestras se retiraron y se analizaron para rhG-CSF mediante un método de HPLC. Como se ve en la Tabla 4, no se encontró rhG-CSF en el flujo. El tampón de elución se alteró a un tampón que contenía arginina y no tenía cloruro de sodio y el pH era 4,0. No se encontró rhG-CSF en la fracción eluida.

Tabla 4.

Muestra	Volumen ml	rhG-CSF µg/ml	Total rhG-CSF µg	Rendimiento%
Material de partida	9	69,4	625	100
Flujo continuo y lavado de equil.	27	0	0	0
Eluato	27	0	0	0

Conclusión

El rhG-CSF no se pudo eluir de la resina Capto MMC™ solo mediante la adición de monoclóridato de arginina 0,5 M al tampón, sin cambiar el pH. Esto puede funcionar como un paso de lavado.

Ejemplo de referencia 5 (Experimento 5)

Material de partida

El rhG-CSF purificado se diluyó en un tampón de equilibrio para reducir la concentración de proteína total y para conseguir un volumen más conveniente antes de cargarse en una columna Capto MMC™. El rhG-CSF estaba disuelto antes de la dilución en acetato de sodio 20 mM, NaCl 0,5M, Tween 20 0,02%, pH 4,0.

Resina y columna cromatográficas

Se usó Capto MMC™, una resina en modo mixto de GE Healthcare (n. ° de cat. 17-5317), como etapa de captura para la molécula de rhG-CSF. Capto MMC™ es una resina catiónica débil con interacciones hidrofóbicas y tiofílicas y enlaces de hidrógeno. Una columna Tricorn 5/150 (GE Healthcare) se empaquetó con resina Capto MMC™ a una altura de lecho de 15 cm. El volumen de columna (CV) de Capto MMC™ fue de 3 ml.

Tampones

Tampón de equilibrado: acetato sódico 20 mM, NaCl 0,1 M, polisorbato 80 al 0,02%, a pH 4,0

Tampón de elución: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, monoclóhidrato de arginina 1 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 4,0.

Configuración experimental

La columna se equilibró con tampón de equilibrado seguido de la carga del material de partida a un caudal de 1 ml/min. Esto fue seguido por una etapa de lavado con el tampón de equilibrado y luego se eluyó la columna usando el tampón de elución. Las muestras se retiraron y se analizaron para rhG-CSF mediante un método de HPLC. El análisis mostró que rhG-CSF se unía a la resina Capto MMC™ durante estas condiciones de tampón. Como se ve en la Tabla 5, no se encontró rhG-CSF en el flujo continuo. El tampón de elución se modificó a un tampón que contenía arginina y sin cloruro sódico y el pH era 4,0, el mismo que en el tampón de equilibrado. No se encontró rhG-CSF en la fracción eluida. Esto significa que una mayor concentración de arginina (1 M) no tuvo ningún efecto sobre la elución de rhG-CSF de la columna Capto MMC™. Pero como se ve en la figura 3, se obtuvo un pico cuando la columna se eluyó mediante el tampón de elución que contiene 1M de arginina y pH 4. El segundo pico grande es el resultado del lavado con NaOH 1M.

Tabla 5.

Muestra	Volumen ml	rhG-CSF µg/ml	Total rhG-CSF µg	Rendimiento%
Material de partida	9,04	69,4	723	100
Flujo continuo y lavado de equil.	18	0	0	0
Eluato	9	0	0	0

Conclusión

El rhG-CSF no se pudo eluir de la resina Capto MMC™ solo añadiendo monoclóhidrato de arginina 1 M al tampón, sin cambiar el pH. Esto puede funcionar como un paso de lavado.

Leyenda de Figura de la Figura 3.

Experimento 5; Un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 4,0 utilizando un tampón de acetato de sodio. La absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) medida se presentan en la figura. La columna se eluyó usando un tampón con pH 4,0 que contenía monoclóhidrato de arginina 1M. Se obtuvo un doble pico por elución. Se obtuvo un único pico en la fracción de eluato. Se obtuvo un pico grande mediante el lavado con NaOH 1M.

Ejemplo 6 (Experimentos 6, 7, 8, 9, 10, 11)

Material de partida

El rhG-CSF purificado se diluyó en un tampón de equilibrado para disminuir la concentración de proteína total y para conseguir un volumen más conveniente antes de cargarse en una columna Capto MMC™. Y también para alcanzar el pH que se solicitó para cada experimento. El rhG-CSF estaba disuelto antes de la dilución en 20 mM de acetato de sodio, 0,2 M de NaCl, 0,02% de Tween 20, pH 6,5.

Resina y columna cromatográficas

Se usó Capto MMC™, una resina de modo mixto de GE Healthcare (n.º de cat. 17-5317), como etapa de captura para la molécula de rhG-CSF. Capto MMC™ es una resina catiónica débil con interacciones hidrofóbicas y tiofílicas y enlaces de hidrógeno. Una columna Tricorn 5/150 (GE Healthcare) se empaquetó con resina Capto MMC™ a una altura de lecho de 15 cm. El volumen de columna (CV) de Capto MMC™ fue de 3 ml.

Tampones

Experimento 6

Tampón de equilibrado: acetato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, 0,02% de Polisorbato 80, pH 4,0

Tampón de lavado: NaAc 20 mM, NaCl 1 M, 0,02% de Polisorbato 80, pH 4,0

Tampón de elución: citrato de sodio 20 mM, monoclóhidrato de arginina 0,5 M, NaCl 0,1 M, 0,02% de Polisorbato 80, pH 7,0.

Experimento 7

Tampón de equilibrado: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, 0,02% de Polisorbato 80, pH 5,0

Tampón de elución: citrato de sodio 20 mM, monoclóhidrato de arginina 0,5 M de, NaCl 0,1 M, 0,02% de Polisorbato 80, pH 7,0.

Experimento 8

Tampón de equilibrado: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, 0,02% de Polisorbato 80, pH 6,0

Tampón de elución: citrato de sodio 20 mM, monoclóhidrato de arginina 0,5 M de, NaCl 0,1 M, 0,02% de Polisorbato 80, pH 7,0.

Experimento 9

Tampón de equilibrado: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, 0,02% de Polisorbato 80, pH 6,5

Tampón de elución: citrato de sodio 20 mM, monoclóhidrato de arginina 0,5 M de, NaCl 0,1 M, 0,02% de Polisorbato 80, pH 7,0.

Experimento 10

Tampón de equilibrado: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, 0,02% de Polisorbato 80, pH 5,5

Tampón de elución: citrato de sodio 20 mM, monoclóhidrato de arginina 0,5 M de, NaCl 0,1 M, 0,02% de Polisorbato 80, pH 7,0.

Experimento 11

Tampón de equilibrado: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, 0,02% de Polisorbato 80, pH 4,0

Tampón de elución: citrato de sodio 20 mM, monoclóhidrato de arginina 0,5 M de, NaCl 0,1 M, 0,02% de Polisorbato 80, pH 7,0.

Configuración experimental

Cada experimento se realizó de la siguiente manera. El rhG-CSF purificado se diluyó aproximadamente 1 en 20 con el tampón de equilibrado a usar. El pH del material de partida se controló y fue en todos los experimentos el mismo que el tampón de equilibrado sin ajustar. La columna se equilibró con tampón de equilibrado seguido de la carga del material de partida a un caudal de 1 ml/min. Esto fue seguido por una etapa de lavado con el tampón de equilibrado y luego se eluyó la columna usando el tampón de elución. En el experimento 6, la columna también se lavó con un tampón que contenía NaCl 1 M antes de la elución. Las muestras se retiraron y se analizaron para rhG-CSF mediante un método de HPLC.

Como se ve en la figura 4 en el Experimento 6, no se obtuvo un pico en el lavado con NaCl 1 M, lo que indica que no se eliminó por lavado el rhG-CSF de la columna Capto MMC™. Se obtuvo el mismo perfil de elución cuando se purificó G-CSF en una columna Capto MMC™ independientemente si se usó un tampón de acetato de sodio o un tampón de citrato de sodio a pH 4 (Experimento 6 y Experimento 11).

Los resultados del análisis para mostrar a qué nivel se une rhG-CSF a Capto MMC™ y cuyo rendimiento se obtiene se presentan en la tabla 6.

Tabla 6.

Nº Experimento	pH en la muestra de carga	G-CSF en el Flujo continuo %	G-CSF en el Eluato %	Figura
6	4,0	0	105	4
11	4,0	0	100	5
7	5,0	0	98	6
10	5,5	0	97	7
8	6,0	0	97	8
9	6,5	26,8	25,7	9

Los datos de la tabla 6 muestran que G-CSF se une a la resina Capto MMC™ a un pH entre 4 y 6 sin pérdida de material en el flujo continuo. Pero con pH 6,5 en el material de partida, la mayoría del G-CSF detectado se encontró en la fracción de flujo continuo.

La columna Capto MMC™ se eluyó con un conjunto de tampón a pH 7 y que contiene 0,5 M de arginina. La recuperación de G-CSF fue alta cuando el material se cargó en la columna a pH 4 a 6, mientras que cuando se usó pH 6,5 en el material de partida, el rendimiento en el eluato fue bajo.

En los cromatogramas siguientes (Figuras 4, 5 y 6), se muestra que cuando rhG-CSF está en un tampón con pH 4 o 5, se eluye de una columna Capto MMC™ como un doble pico. Mientras que se obtuvo un único pico cuando el pH del material de partida era 5,5, 6,0 o 6,5 (Figuras 7, 8 y 9). Como se muestra en la SDS PAGE teñida con plata (Figura 10A) el eluato del Experimento 8 (pH 6,0), el Experimento 9 (pH 6,5) y el Experimento 10 (pH 5,5) tienen una banda única buena. Mientras que el eluato del Experimento 6 (pH 4,0) y el Experimento 7 (pH 5,0) muestra más bandas en la SDS-PAGE teñida con plata (Figura 10B).

Conclusión

Los resultados de estos experimentos muestran que rhG-CSF puede unirse a Capto MMC™ a pH 4,0, 5,0, 5,5, 6,0. La unión de rhG-CSF a Capto MMC™ a pH 6,5 es menos fuerte y se encontró rhG-CSF en la fracción de flujo continuo, que no era el caso a pH entre 4 y 6.

El perfil de elución es mejor cuando se usó pH de 5,5 a 6,5 y el producto se ve mejor en una SDS-PAGE cuando se usó este pH en el material de carga.

Debido a la fuga de G-CSF en la columna Capto MMC™ cuando se usó pH 6,5, se usa preferiblemente pH 5,5 a 6,0 sobre el material de carga.

El material unido se eluyó a pH 7 en todos los experimentos, y el pico se concentró más cuando se incluyó monoclóhidrato de arginina 0,5 M en el tampón de elución. Se puede realizar un lavado de NaCl 1 M a pH 4 sin pérdida de G-CSF.

Leyendas de figuras para las figuras 4-10.

Experimento 6; Un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 4,0 del material de partida usando un tampón de acetato de sodio. La absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) medida se presentan en la figura. La columna se eluyó usando un tampón con pH 7,0 que contenía monoclóhidrato de arginina 0,5M. Se obtuvo un doble pico por elución. El doble pico se recogió como una fracción.

Figura 5.

Experimento 11; Un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 4,0 usando un tampón de citrato de sodio. La absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) medida se presentan en la figura. La columna se eluyó usando un tampón con pH 7,0 que contenía monoclóhidrato de arginina 0,5M. Se obtuvo un doble pico por elución. El doble pico se recogió como una fracción.

Figura 6.

Experimento 7; Un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 5,0 utilizando un tampón de citrato de sodio. La absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) medida se presentan en la figura. La columna se eluyó usando un tampón con pH 7,0 que contenía monoclóhidrato de arginina 0,5M. Se obtuvo un doble pico por elución. El doble pico se recogió como una fracción.

Figura 7.

Experimento 10; Un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 5,5 utilizando un tampón de citrato de sodio. La absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) medida se presentan en la figura. La columna se eluyó usando un tampón con pH 7,0 que contenía monoclóhidrato de arginina 0,5M. Se obtuvo un pico ligeramente no uniforme por la elución.

Figura 8.

Experimento 8; Un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 6,0 usando un tampón de citrato de sodio. La absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) medida se presentan en la figura. La columna se eluyó usando un tampón con pH 7,0 que contenía monoclóhidrato de arginina 0,5M. Se obtuvo un pico uniforme concentrado.

Figura 9.

El experimento 9; Un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC™ a pH 6,5 utilizando un tampón de citrato de sodio. La absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) medida se presentan en la figura. La columna se eluyó usando un tampón con pH 7,0 que contenía monoclóhidrato de arginina 0,5M. Se obtuvo un pico uniforme concentrado.

Figura 10A y Figura 10B

Experimento 6, 7, 8, 9, 10; Separación de proteínas en el inicio y elución de los experimentos de Capto MMC™ donde se usaron diferentes valores de pH en el material de partida. Las muestras se reducen (tratadas con SDS) y se separan en un gel de poliacrilamida al 10%. Las proteínas son visualizadas por una tinción de plata.

Ejemplo de referencia 7 (Experimento 12)

Material de partida

El G-CSF humano recombinante se produjo en células HEK 293. Las células se eliminaron y el sobrenadante libre de células fue el material de partida cargado en la columna Capto MMC™.

Resina y columna cromatográficas

Se usó Capto MMC™, una resina de modo mixto de GE Healthcare (n.º de cat. 17-5317), como etapa de captura para la molécula de rhG-CSF. Capto MMC™ es una resina catiónica débil con interacciones hidrofóbicas y tiofílicas y enlaces de hidrógeno. Una columna XK16 (GE Healthcare) se rellenó con resina Capto MMC™ a una altura de lecho de 13,5 cm. El volumen de columna (CV) de Capto MMC™ fue de 27 ml.

Tampones

Tampón de equilibrado: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 6,0

Tampón de elución a: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, monoclóhidrato de arginina 0,5 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 7,0.

Configuración experimental

El pH del sobrenadante libre de células se ajustó a 6,0. La columna se equilibró con tampón de equilibrado seguido de cargar el material de partida ajustado por pH a un caudal de 13,5 ml/min. Esto fue seguido por una etapa de lavado con el tampón de equilibrado y luego se eluyó la columna usando el tampón de elución. Las muestras fueron retiradas y analizadas para rhG-CSF por un método de HPLC. El análisis mostró que todo el rhG-CSF cargado en la columna unida a la resina Capto MMC™ durante estas condiciones de tampón, no se encontró G-CSF en la fracción de flujo continuo. El tampón de elución contenía Citrato de Na 20 mM, arginina 0,5 M, NaCl 0,1 M y polisorbato 80 al 0,02%, y el pH era 7,0. La elución de las proteínas unidas a la resina Capto MMC™ dio como resultado un pico principal y un segundo pico pequeño. Todo el G-CSF cargado en la columna Capto MMC™ se encontró en el pico principal y no se detectó G-CSF en el segundo pico pequeño (Figura 11).

Conclusión

El G-CSF humano recombinante en medio cultivado libre de células se une a una resina Capto MMC™ a pH 6,0.

No se encontró G-CSF en la fracción de flujo continuo.

El material unido se eluyó de la resina Capto MMC™ alterando el pH a 7 y añadiendo arginina 0,5M para concentrar el pico de elución.

Leyenda de figura de la Figura 11

Experimento 12; Un cromatograma de la purificación de G-CSF de un sobrenadante libre de células en una columna Capto MMC™ a pH 6,0 usando un tampón de citrato sódico.

La absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) medida se presentan en la figura. La columna se eluyó usando un tampón con pH 7,0 que contenía monoclóhidrato de arginina 0,5M. Se obtuvo un doble pico pero el G-CSF solo se encontró en el pico principal.

Ejemplo de referencia 8

Columna y resina

Se empaquetó una columna Tricorn 5/50 (GE Healthcare) con un afinidad por ligando basado en el fragmento Fab derivado de levadura acoplado a una matriz base Capto MP. La altura de lecho fue de aproximadamente 2 cm, dando un volumen de resina de la aplicación de 0,4 ml. El prototipo de resina de afinidad (G-CSF8) se obtuvo de BAC BV.

Material de partida

El material de partida utilizado fue un sobrenadante celular que contenía G-CSF producido en células HEK293F.

5 Composiciones de tampón:

Tampón A (tampón de equilibrado)

NaCl 0,3 M, citrato de Na 0,02 M, Tween 20 al 0,02%, pH 6,0, conductividad 32 mS/cm a +25 ° C

10

Tampón B (tampón de elución I)

NaCl 0,3 M, citrato de Na 0,02 M, Tween 20 al 0,02%, pH 3,0, conductividad 32 mS/cm a + 25°C.

15 La columna se equilibró con el tampón de equilibrado A seguido de la carga del material de partida. La resina se lavó posteriormente con tampón de equilibrado A y el G-CSF unido se eluyó posteriormente con tampón de elución B. El contenido de G-CSF en el material de partida y el eluato se analizaron (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados del experimento de resina de afinidad a G-CSF, elución con pH 3

Muestra	Volumen ml	G-CSF (µg/ml)	Cantidad total de G-CSF (µg)	Rendimiento (%)
Material de partida (carga)	100	2	200	100
Eluato (Tampón B)	1,5	111	170	83

20

La Figura 12 muestra una SDS-PAGE teñida con Coomassie que muestra el eluato después de la etapa de cromatografía de afinidad.

Carril	Muestra
1	Estándar de peso molecular
2	Eluato (Ejemplo 8)

25 Conclusión ejemplo 8

Se logró una pureza y una recuperación excelentes cuando se usa un tampón de pH bajo (pH 3) para eluir G-CSF.

Ejemplo de referencia 9

30

Columna y resina

Se empaquetó una columna Tricorn 5/50 (GE Healthcare) con un afinidad por ligando basado en el fragmento Fab derivado de levadura acoplado a una matriz base Capto MP. La altura de la cama fue de aproximadamente 2 cm, dando un volumen de resina de la aplicación. 0.4 ml. El prototipo de resina de afinidad (G-CSF8) se obtuvo de BAC BV.

35

Material de partida

El material de partida utilizado fue un sobrenadante celular que contenía G-CSF de células HEK293F.

Composiciones tampón:

Tampón A (tampón de equilibrado)

45

NaCl 0,3 M, citrato sódico 0,02 M, Tween 20 al 0,02%, pH 6,0, conductividad 32 mS/cm a +25 ° C

Tampón C (tampón de elución II)

50 NaCl 1,0 M, citrato de Na 0,02 M, Arg 0,8 M, Tween 20 al 0,02%, pH 6,0, conductividad 89 mS/cm a + 25 ° C.

Los tampones de equilibrado y elución no están limitados al pH, las concentraciones y el tipo de tampón, sales o detergentes indicados. La columna se equilibró con el tampón A de equilibrado seguido de la carga del material de partida. Después, la resina se lavó con tampón de equilibrado A y el G-CSF unido se eluyó posteriormente con tampón de elución C. Se analizó el contenido de G-CSF en el material de partida y el eluato (Tabla 8).

55

Tabla 8. Resultados del experimento de resina de afinidad a G-CSF, elución con arginina

Muestra	Volumen ml	G-CSF ($\mu\text{g/ml}$)	Cantidad total de G-CSF (μg)	Rendimiento (%)
Material de partida (carga)	100	2	200	100
Eluato (Tampón B)	3,7	30	110	56

Conclusión del ejemplo 9

- 5 Es posible eluir G-CSF de la columna de afinidad usando una mezcla de cloruro de sodio y arginina.

Ejemplo de referencia 10

Columna y resina

- 10 Se empaquetó una columna Tricorn 5/50 (GE Healthcare) con un afinidad por ligando basado en el fragmento Fab derivado de levadura acoplado a una matriz base Capto MP. La altura de lecho fue de aproximadamente 2 cm, dando un volumen de resina de la aplicación de 0,4 ml. El prototipo de resina de afinidad (G-CSF8) se obtuvo de BAC BV.

15 Material de partida

El material de partida utilizado fue un sobrenadante celular que contenía G-CSF de células HEK293F.

- 20 Composiciones tampón:

Tampón A (tampón de equilibrado)

NaCl 0,3 M, citrato de Na 0,02 M, 0,02% de Tween 20, pH 6,0, conductividad 32 mS/cm a + 25 °C

- 25 Tampón D (Tampón de elución III)

MgCl₂ 2,0 M, Tris 0,02 M, Tween 20 al 0,02%, pH 7,5, conductividad 144 mS/cm a + 25 °C.

- 30 Los tampones de equilibrado y elución no están limitados al pH, las concentraciones y el tipo de tampón, sales o detergentes establecidos. La columna se equilibró con el tampón A de equilibrado seguido de la carga del material de partida. Después, la resina se lavó con el tampón A de equilibrado y el G-CSF unido se eluyó posteriormente con tampón D de elución. El contenido de G-CSF en el material de partida y el eluato se analizaron (Tabla 9).

- 35 Tabla 9. Resultados del experimento de resina de afinidad a G-CSF, elución con MgCl₂

Muestra	Volumen ml	G-CSF ($\mu\text{g/ml}$)	Cantidad total de G-CSF (μg)	Rendimiento (%)
Material de partida (carga)	100	12	1200	100
Eluato (Tampón B)	2,5	390	970	81

Conclusión del ejemplo 10

Es posible eluir G-CSF de la columna de afinidad usando MgCl₂ 2 M como eluyente.

- 40 Ejemplo de referencia 11

Columna y resina

- 45 Se rellenaron columnas Tricorn 5/50 (GE Healthcare) con 3 diferentes prototipos de ligandos de afinidad basados en fragmentos Fab derivados de levadura, acoplados a una matriz base Capto MP. La altura de lecho fue de aproximadamente 2 cm, dando un volumen de resina de la aplicación de 0,4 ml. Los prototipos de resina de afinidad (G-CSF2, G-CSF3 y G-CSF6) se obtuvieron de BAC BV.

- 50 Material de partida

El material de partida utilizado fue un sobrenadante celular que contenía G-CSF de células HEK293F.

Composiciones tampón:

- 55 Tampón A (tampón de equilibrado)

NaCl 0,3 M, citrato de Na 0,02 M, Tween 20 al 0,02%, pH 6,0, conductividad 32 mS/cm a + 25 ° C

Tampón B (tampón de elución I)

- 5 NaCl 0,3 M, citrato de Na 0,02 M, Tween 20 al 0,02%, pH 3,0, conductividad 32 mS/cm a + 25 ° C.

Las columnas se equilibraron con el tampón de equilibrado A seguido de la carga del material de partida. Las resinas se lavaron a continuación con tampón A de equilibrado y el G-CSF unido se eluyó posteriormente con tampón de elución B. El contenido de G-CSF en el material de partida, fracciones de flujo y eluidos se analizaron (Tabla).

- 10 Tabla 10. Resultados del experimento de resina de afinidad a G-CSF, pruebas de diferentes prototipos de ligandos de afinidad a pH 3

Muestra	Volumen ml	G-CSF (µg/ml)	Cantidad total de G-CSF (µg)	Rendimiento (%)
Ligando G-CSF2				
Material de partida (carga)	100	10	1100	100
Fracción de flujo continuo	112,5	4	500	45
Eluato (Tampón B)	2	290	570	57
Ligando G-CSF3				
Material de partida (carga)	100	11	1100	100
Fracción de flujo continuo	112,5	0	0	0
Eluato (Tampón B)	2	510	1020	93
Ligando G-CSF6				
Material de partida (carga)	100	12	1200	100
Fracción de flujo continuo	112,5	2	200	19
Eluato (Tampón B)	1,5	450	670	56

- 15 La figura 13 muestra una SDS-PAGE teñida con plata que muestra el material de partida, el flujo continuo y el eluato después de la etapa de cromatografía de afinidad.

Carril	Muestra
1	Inicio G-CSF2
2	flujo continuo G-CSF2
3	Blanco
4	Eluato G-CSF2
5	Blanco
6	flujo continuo G-CSF3
7	Blanco
8	Eluato G-CSF3
9	Blanco
10	flujo continuo G-CSF6
11	Blanco
12	Eluato G-CSF6

Conclusión ejemplo 11

- 20 Distintos prototipos de ligandos de afinidad proporcionan una capacidad de unión diferente a G-CSF, como se muestra por la detección de GCSF en el flujo continuo y la recuperación variable en la fracción de elución usando un pH bajo como eluyente. Sin embargo, como se muestra en la figura 13, todos los ligandos de afinidad proporcionan el mismo excelente perfil de pureza en el eluato.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de purificación del factor estimulador de colonias de granulocitos recombinante humano (rhG-CSF) en una secuencia de purificación empleando cromatografía, caracterizado porque

- al menos una cromatografía se realiza usando resina Capto MMC™,
- rhG-CSF se une a la resina Capto MMC™ a un pH entre 4 y 6, y
- el rhG-CSF se eluye a un pH entre 5,5 y 6,5 y en donde la elución se realiza con arginina que tiene una concentración en el rango de 0,1 M a 2,0 M,
- opcionalmente en combinación con una etapa de cromatografía de afinidad por ligando que emplea un fragmento F_{ab} derivado de levadura dirigido contra el rhG-CSF.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se usa una sustancia tamponante que comprende al menos una de las sustancias seleccionadas del grupo que consiste en: citrato de sodio; histidina; ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)-etano sulfónico (HEPES); ácido 2-(N-morfolino)etano sulfónico (MES); base Tris; y acetato de sodio.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el detergente no iónico está presente en cualquiera de los tampones utilizados, dicho detergente no iónico se selecciona en particular del grupo que consiste en Polisorbatos como el Polisorbato 20, 40, 60, 80 y Pluronic F68.

4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque se aplica un tampón de lavado a la resina Capto MMC™, para eliminar los contaminantes y retener el rhG-CSF, antes de liberar el rhG-CSF, caracterizado porque el tampón de lavado comprende un aminoácido que tiene una cadena lateral básica y/o una sal elegida de acuerdo con la serie de Hofmeister.

5. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende los siguientes pasos:

- Cromatografía capto MMC;
- una etapa de inactivación química para virus con cubierta;
- una resina de afinidad basada en un fragmento F_{ab} dirigido contra el rhG-CSF expresado en levadura;
- un intercambiador de cationes como SP Sepharose o Resource S;
- una etapa de eliminación de patógenos por filtración con un tamaño medio de poro de 20 nm tal como Planova 20N;
- una etapa de intercambio y/o concentración de tampón tal como ultrafiltración con un corte aproximado de 1-5 kDa;
- una resina de cromatografía de exclusión por tamaño como Superdex 75.

6. El proceso de la reivindicación 5, caracterizado porque el paso de cromatografía Capto MMC™ se combina con una etapa de cromatografía por afinidad en la que la afinidad es proporcionada por un fragmento F_{ab} derivado de levadura dirigido contra el rhG-CSF y que la pureza del producto resultante de la resina de cromatografía de afinidad es más del 90%.

7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque se realizan pasos de cromatografía adicionales, seleccionado desde la exclusión por tamaño, el intercambio aniónico, el intercambio catiónico, la interacción hidrofóbica y la cromatografía de afinidad con el metal inmovilizado, caracterizado porque la pureza del producto final es más del 99%.

8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la secuencia de purificación comprende además las etapas de eliminación/inactivación de patógenos que comprenden una etapa de inactivación química, una etapa de eliminación basada en el tamaño, pasos de cromatografía o combinaciones de los mismos cuyos pasos se basan en diferentes propiedades fisiológicas dirigidas al patógeno a eliminar.

Figura 1

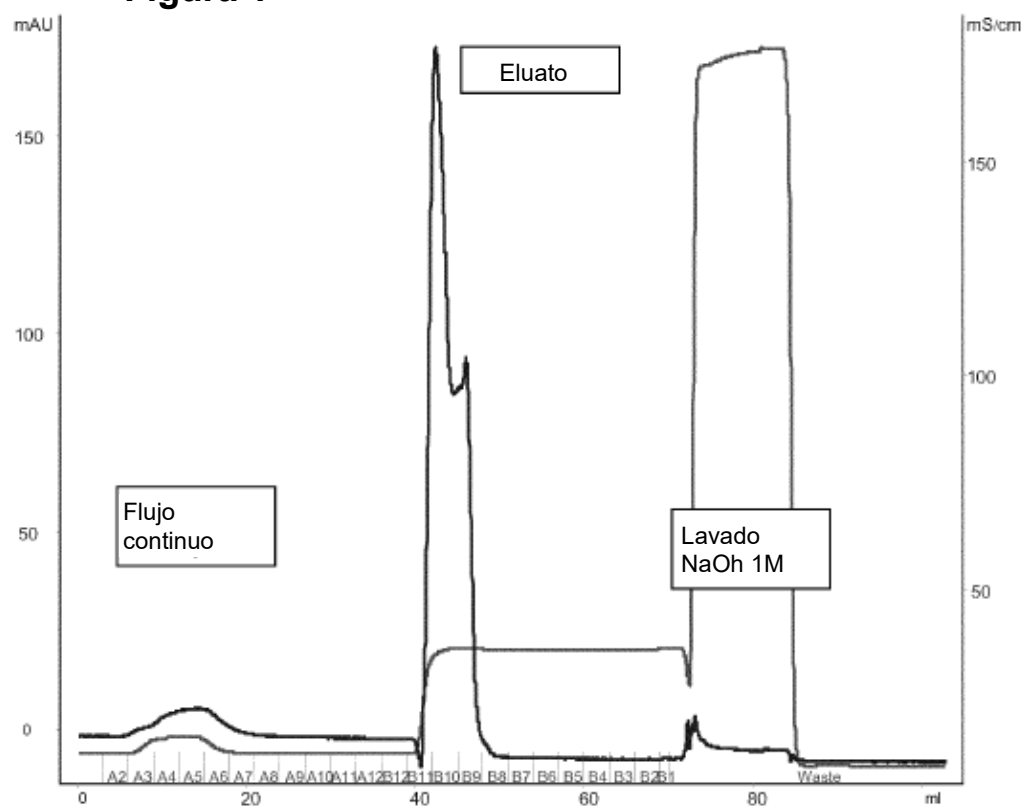


Figura 2

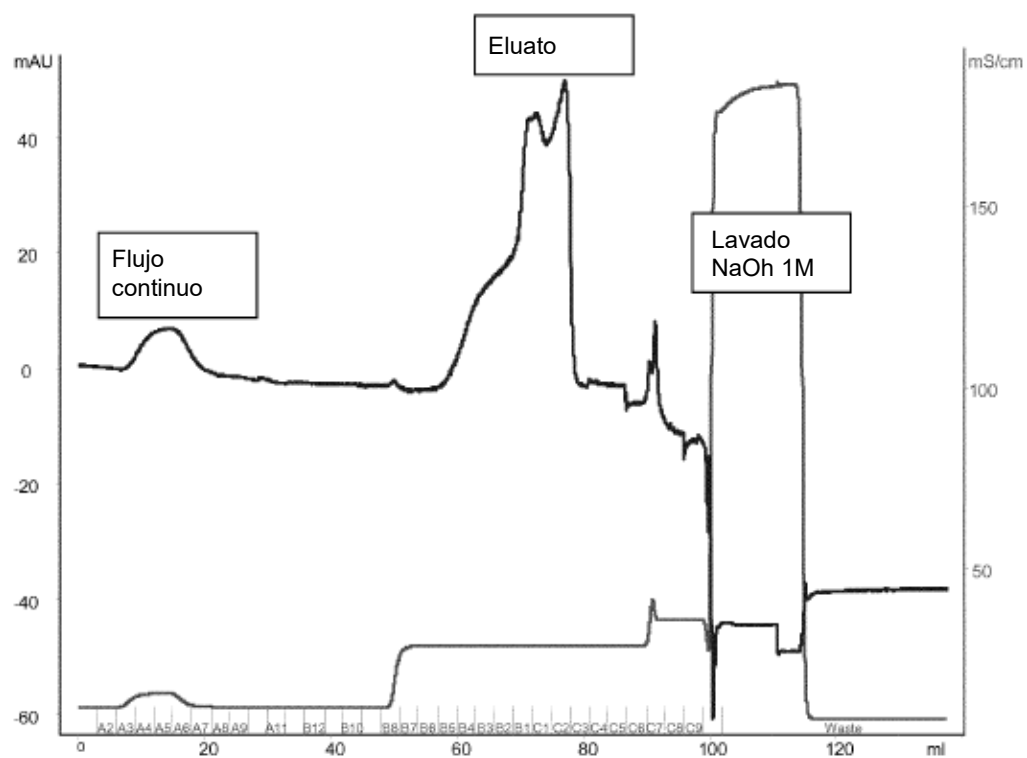


Figura 3

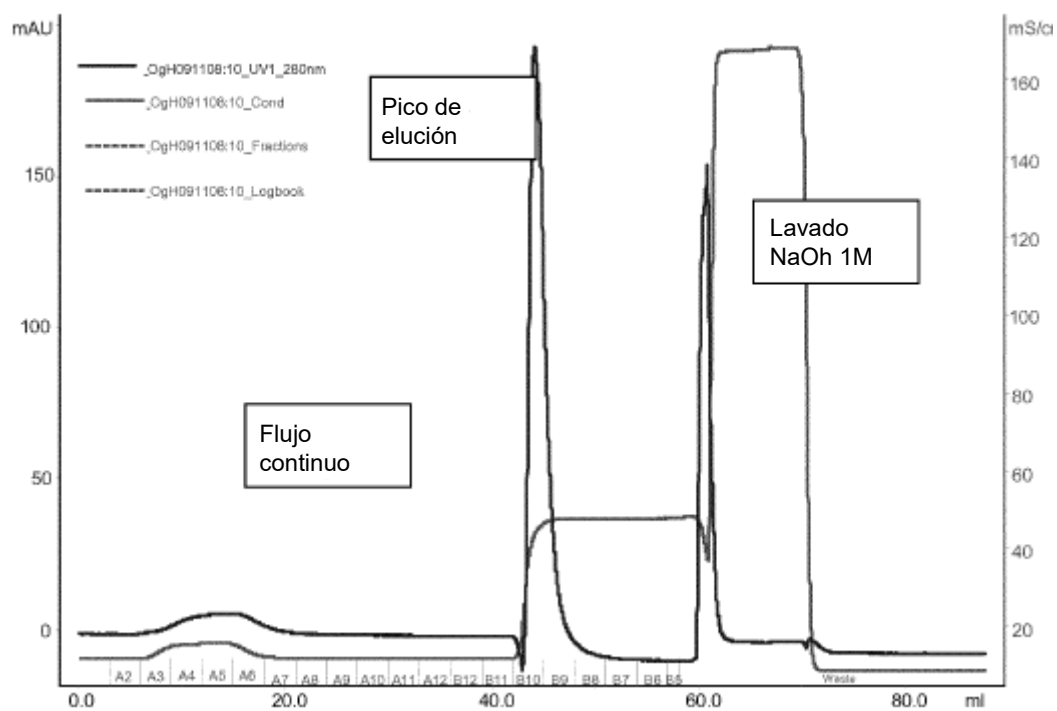


Figura 4

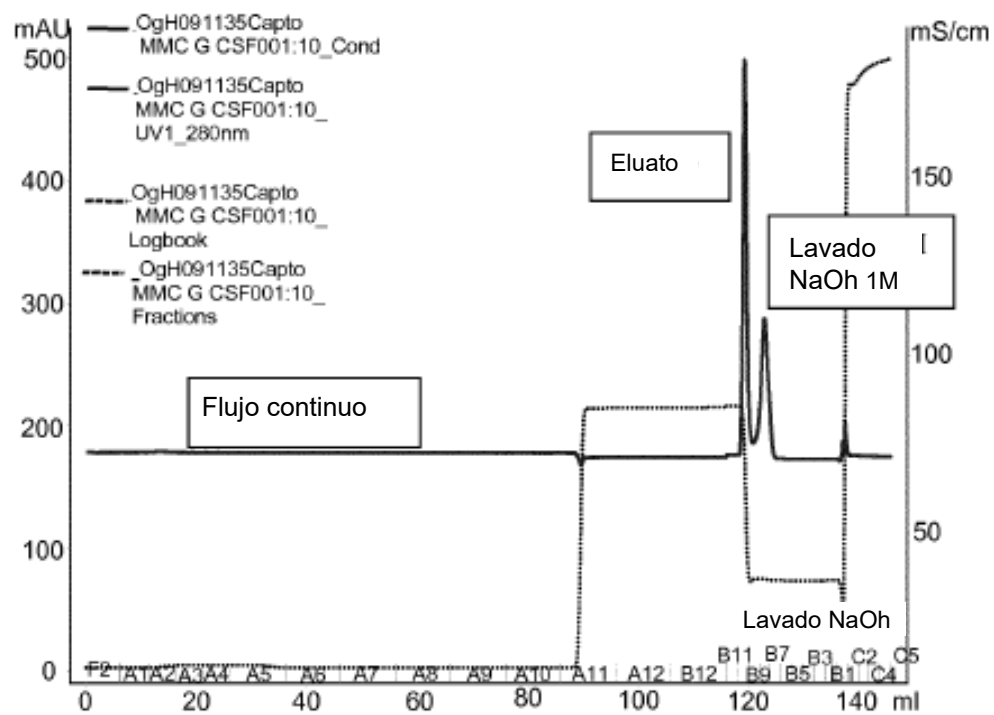


Figura 5

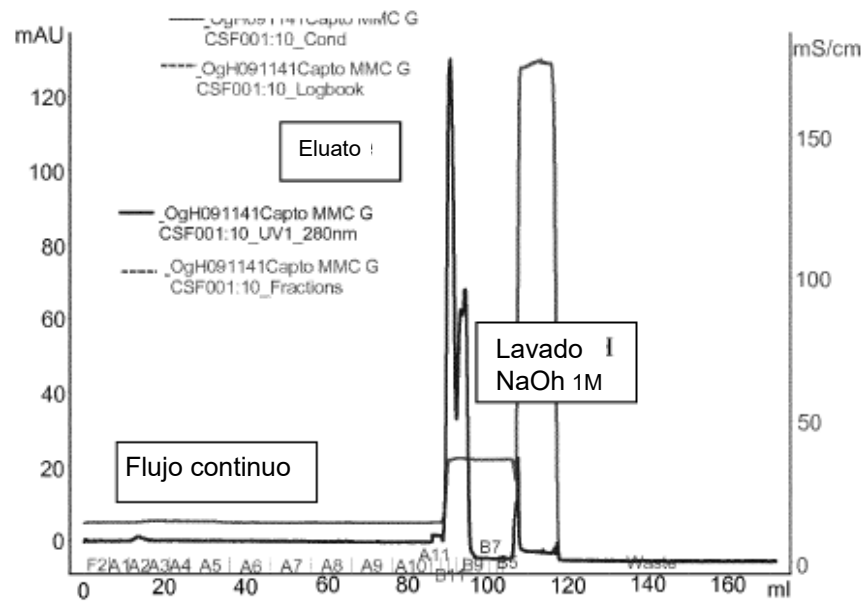


Figura 6

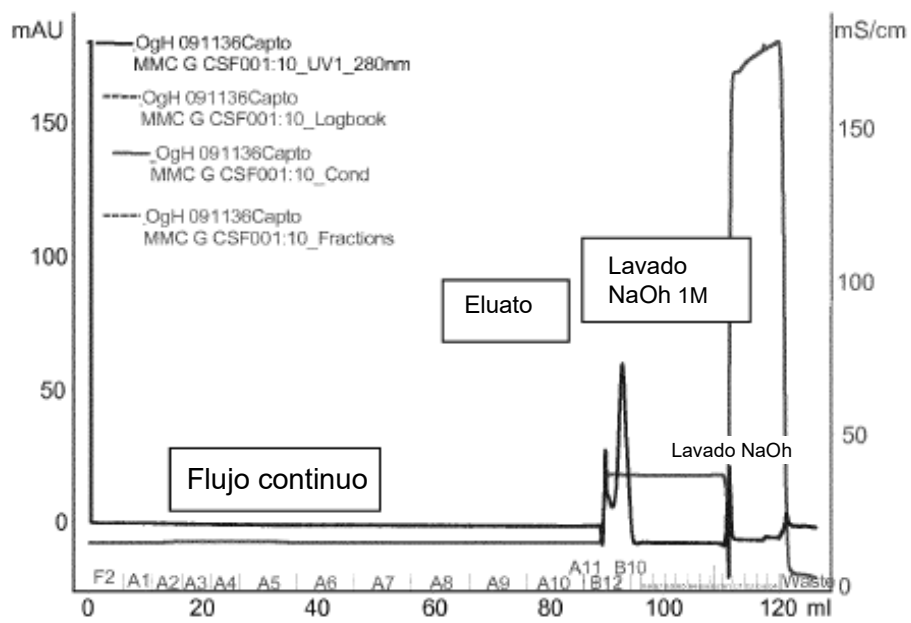


Figura 7

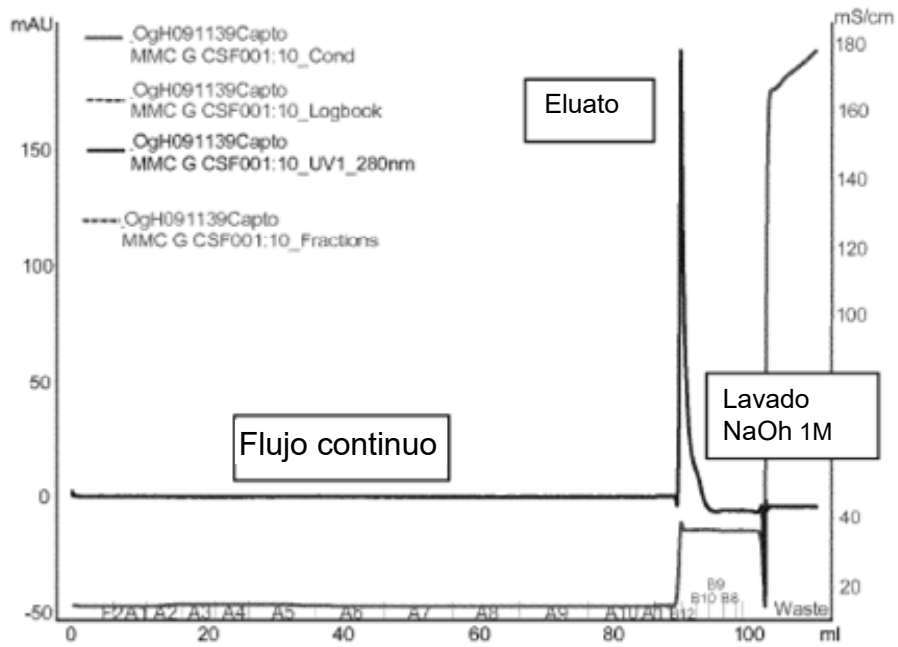
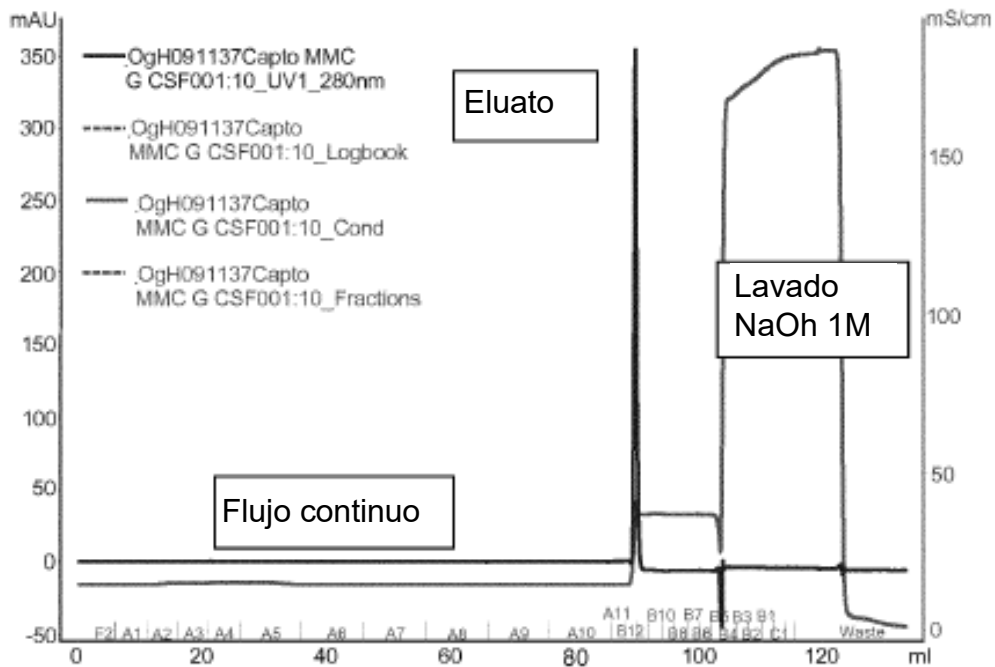


Figura 8



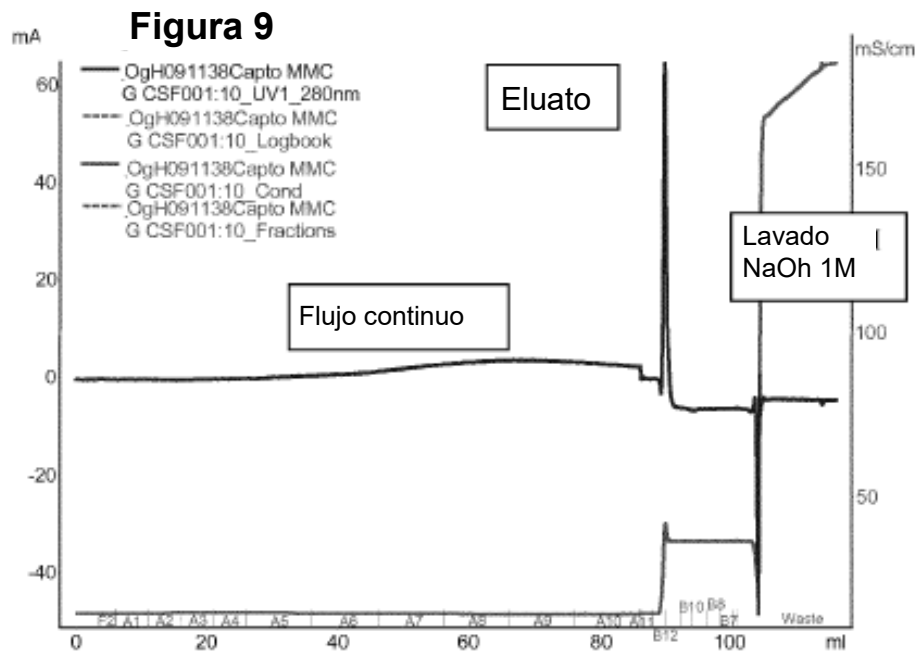


Figura 10

SDS-PAGE al 10%, tinción de plata: tampón MES se utilizó como tampón de migración

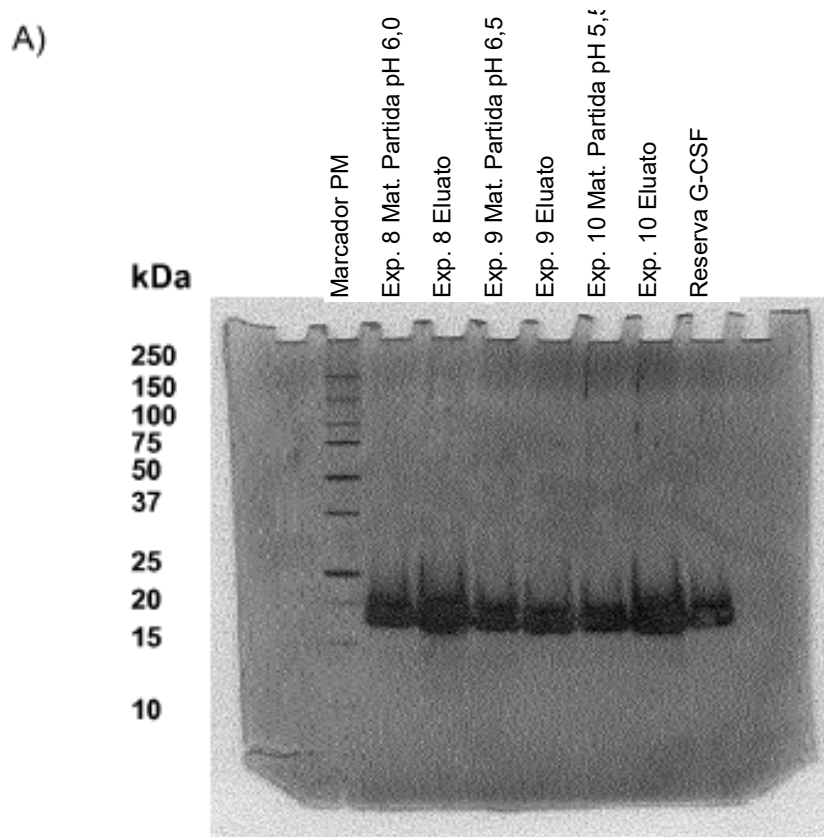


Figura 10

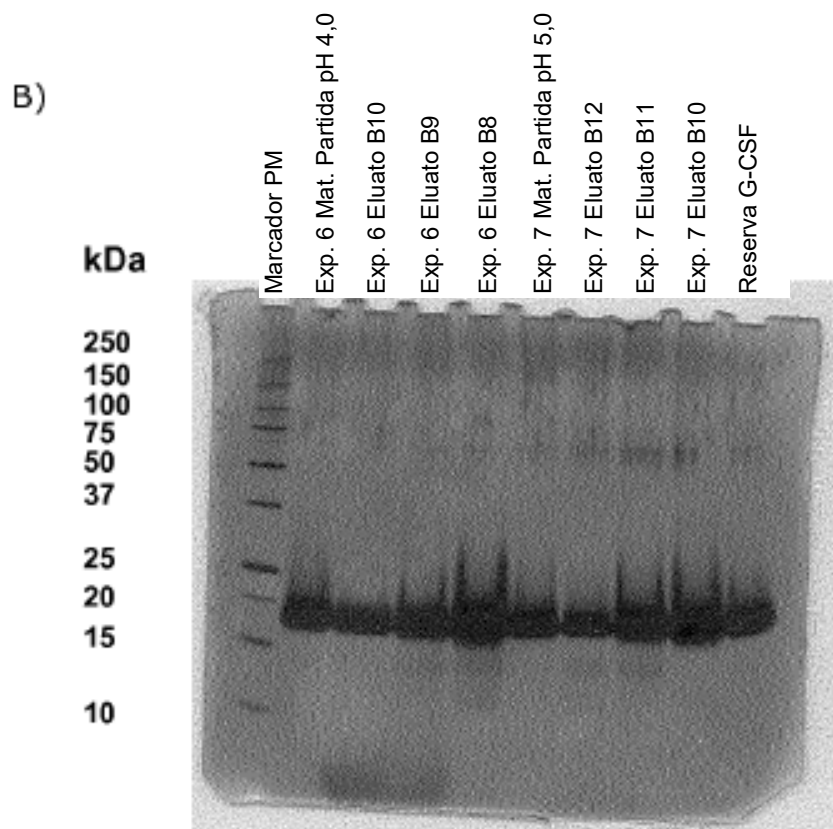


Figura 11

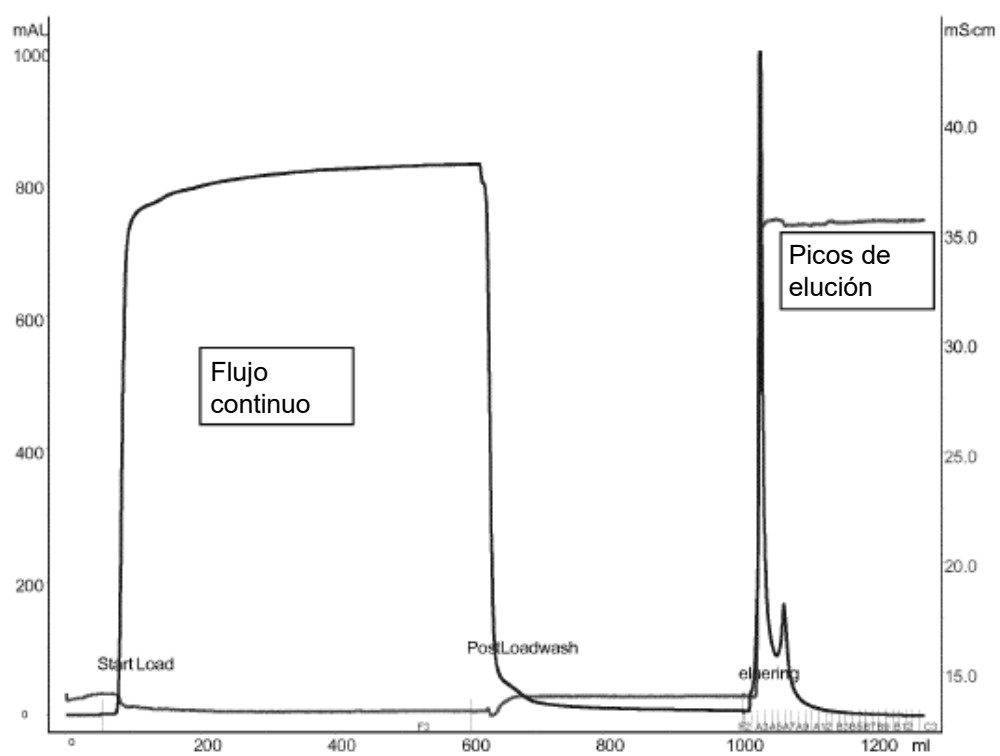


Figura 12

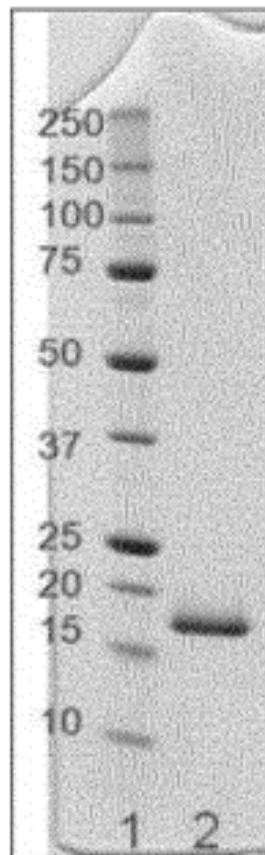


Figura 13

