

MÉTODO PARA LA PURIFICACIÓN DE ALBÚMINA HUMANA

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

Sector tecnológico de la invención

El presente método de purificación de albúmina aporta utilidad dentro del sector de la química y la medicina, la albúmina humana tiene uso en clínico y hospitalario; es de anotar que la Albúmina bovina se puede purificar por el mismo
10 método que la humana y se utiliza en todos los laboratorios de investigación del mundo.

Antecedentes de la invención

La albúmina es la proteína más abundante en el plasma humano. Está
15 constituida por 585 aminoácidos con 17 puentes disulfuro entrecruzados en su molécula y tiene un peso molecular de 67.000 Daltons. Dentro de las principales funciones de la albúmina se encuentra transportar y almacenar una amplia variedad de sustancias de bajo peso molecular como la bilirrubina, el cortisol, las hormonas sexuales, ácidos grasos libres y algunos medicamentos.
20 En los neonatos hiperbilirrubinémicos, la bilirrubina se combina con la albúmina limitando así su ingreso a los tejidos hidrófobos del cerebro, atenuando con ello la toxicidad en los procesos hemolíticos graves que se presentan a esa edad. La mitad del calcio circulante está combinado con la albúmina por lo que la interpretación clínica de la disminución del calcio sérico depende de la
25 concentración de la albúmina. Esto se debe a que la fracción biológicamente activa del calcio es la forma ionizada o libre.

En un accidente, la tasa de remplazo de albúmina para 500ml de sangre perdida, a los 3 días, es apenas de 3,6 y 5,2 g/dl; (en condiciones normales la concentración de proteínas totales oscila entre 6,2 y 7,9 g/dl), a estos niveles
30 bajos de concentración habitualmente se presentan edemas. La albúmina

ejerce entre el 75% y 85% de la presión oncótica de la sangre que es de 20 mmHg. (equivalente a una concentración de albúmina de 5,2 g/dl).

Para estas condiciones y otras patologías es necesario administrar albúmina, la albúmina humana se puede obtener de plasma o suero humano (así como de la placenta humana, en el ámbito industrial se prepara por fraccionamiento de mezclas de plasma obtenido de cientos de donantes sanos. Todas las unidades de plasma utilizadas en el proceso son sometidas individualmente a un despistaje serológico para el antígeno de superficie de la hepatitis B (AgsHB), y anticuerpos para el virus de la hepatitis C (HCV), el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y 2 (HIV 1 y 2), el T. cruzi (enfermedad de Chagas) y el T. pallidum (Sífilis).

El método de Cohn fue desarrollado en 1940 durante la II Guerra Mundial y consiste en someter el plasma humano, a un proceso de fraccionamiento con etanol frío a diferentes concentraciones y variaciones de temperatura, fuerza iónica y pH para obtener diferentes fracciones o pastas, del suero o plasma humano así:

- I. Crioprecipitado, que por purificación posterior permite obtener concentrados de FVIII y Factor von Willebrand (FvW).
- II. Fracción I, que por purificación permite obtener concentrados de fibrinógeno.
- III. Fracción II + III, que por purificación da lugar a las inmunoglobulinas intramusculares (IgIM) o intravenosas (IgIV). - Fracción IV, que por purificación permite obtener concentrados de antitrombina III y α 1-antitripsina.
- IV. Fracción V, que por purificación da lugar a las soluciones de albúmina humana.

La albúmina así preparada tiene una pureza del 95%. En los últimos años este procedimiento ha sido mejorado y ha alcanzado una pureza de 99.3% para los

monómeros de albúmina, luego de este procedimiento el producto se somete a pasteurización, calentándolo a 60°C por 10 horas, ya que el fraccionamiento con etanol tiene actividad viricida y bactericida, y la pasteurización garantiza aún más la seguridad transfusional del producto.

5

Este procedimiento actualmente es el más eficiente, pero dispendioso y costoso porque exige de al menos 21 columnas de cromatografía, en comparación a nuestro método de purificación que simplifica el proceso y su cantidad de pasos, pues solo necesita de una columna cromatografía mediante el método de exclusión.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El objetivo del presente método es optimizar la precipitación de proteínas antes de la purificación mediante cromatografía, a continuación, se muestra los reactivos usuales y el proceso necesario para tal fin.

15

Reactivos

I. Ácido Acético

20

II. Etanol al 95%

III. Acetato pH 4.0, (acetato de sodio, ácido acético).

IV. Solución tampón de acetato pH 5.2.

V. Solución tampón de acetato pH 4.5.

VI. Solución de NaCl.

25

VII. Solución de NaCl pH 6.0

VIII. Caprilato de sodio sólido 0.026592 gramos / gramo de albúmina

El nuevo proceso de purificación de albúmina se divide se compone de las siguientes operaciones.

CRIO- PRECIPITADO

5

Se toman 500 ml de plasma humano, el cual ya está certificado y viene congelado a temperaturas por debajo de 0°C (pueden alcanzar los -100°C), por lo que debe descongelarse entre 0 a 38°C (a temperatura regular humana) y luego se mantienen en hielo durante 10 a 40 min, para alcanzar una temperatura entre 0 a 10°C, se centrifuga entre 5.000 - 15.000 r.p.m. durante 8 a 15 minutos.

10

El precipitado lo descartamos y etiquetamos el sobrenadante como crio-sobrenadante.

PRECIPITACIÓN CON ETANOL

15

El CRIO-SOBRENADANTE debe ajustarse hasta alcanzar un pH de 7 a 9, este ajuste se puede hacer con buffers, soluciones tampón, ácidos o bases, según sea el caso de las condiciones iniciales del sobrenadante, y se baja la temperatura gradualmente hasta - 5°C.

20

Se adiciona al plasma etanol al 95% frío (-30°C a 0°C) hasta completar una relación entre 15 a 25% respecto al sobrenadante, a una velocidad aproximada de 1 a 10 ml / min, mezclando el plasma continuamente.

25

La solución plasma / etanol se deja en reposo durante mínimo 6 horas (12, 18 o 24 horas o según necesidades de producción) a una temperatura no mayor a 0°C. (-100 - 0°C).

Después de este reposo se precipitan varias proteínas, las cuales se centrifuga de 5.000 - 15.000 r.p.m durante 8 a 15 minutos, a una temperatura no superior a 0°C.

- 5 Este paso es el que diferencia a este proceso del estado de la técnica, debido a que con la adición de etanol frio y el suficiente tiempo para permitir la precipitación se pueden retirar gran parte de las proteínas, que normalmente se retiran en la cromatografía, de tal modo que precipitado se descarta, el sobrenadante será etiquetado como sobrenadante básico.

10

- Al SOBRENADANTE BÁSICO, se le ajusta el pH ahora mediante tampón de 4 a 6.9, este ajuste se debe llevar a una temperatura no mayor a 0°C, vuelve y se adiciona etanol al 95 % como en el paso anterior, llevando el volumen de adición entre un 12 a 24%, nuevamente se deja en reposo mínimo 6 horas 12, 18 o 24
15 horas o según necesidades de producción), se vuelve a centrifugar igual que en el paso anterior, se descarta el precipitado y el sobrenadante se etiqueta como sobrenadante ácido.

- Se determina la concentración proteica del **SOBRENADANTE ÁCIDO** mediante
20 espectrofotometría, como lo puede ser Absorbancia a 280 nm, utilizando el coeficiente de absorción 0.66 para la albúmina. Diluyendo la solución proteica 1:100 y 1:50 se determina además el volumen de la solución y su concentración, así mismo como la masa.

- 25 Utilizando la fórmula $C_1 * V_1 = C_2 * V_2$, se busca un volumen 2 donde la concentración sea un 5 a 15% (w/v), el método para concentrar este sobrenadante ácido, es filtrar por una membrana de 2 micras y se desalcoholiza vía diálisis (o diafiltración).

- Con la solución tampón de acetato, se le mide la conductividad a la solución
30 proteica y a la solución tampón, después de la diálisis la solución proteica debe

tener la conductividad de la solución tampón y se etiqueta como sobrenadante concentrado.

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO Y EXCLUSIÓN

5

En una columna de cromatografía con DEAE-Sepharose FF (propia para intercambio aniónico, también se pueden usar aminopersulfato o polietilenglicol), previamente desgasificado, se equilibra la columna con la solución tampón de acetato pH entre 5 a 6.9 a una velocidad de flujo de 1 a 10 ml / min.

10

El sobrenadante concentrado se hace correr en la columna con el flujo anterior. En este punto muchas proteínas junto con la albúmina están capturadas en la columna, el eluyente sigue siendo el buffer acetato entre 5 a 6.9.

15

La solución de lavado es la misma solución tampón acetato a 5 a 6.9. y la de elusión es acetato pH 3 a 4.9

Para comenzar la exclusión elusión de la albúmina se corre una solución tampón buffer de acetato a 3 a 4.9 que eluirá exclusivamente la albúmina, el saliente de esta elusión se etiquetara como albúmina colectada.

20

El punto de inicio y el punto final de la elusión se determinan por conductividad eléctrica de las soluciones tampón, solo cuando la conductividad eléctrica sea igual al amortiguador de entrada como al amortiguador de salida, se entenderá que ya no hay proteína

25

Finalmente, otras proteínas son eluidas del gel con una solución tampón pH a 4.0.

COLECCIÓN DE LA MUESTRA

Se determina nuevamente mediante A_{280} nm la concentración de la solución de ALBÚMINA COLECTADA. Nuevamente mediante diálisis en membrana se
5 concentrará a solución hasta llevarla a un 5 a 15%. Se etiqueta como sobrenadante proteico.

Y mediante electroforesis SDS-PAGE se determina la pureza y la presencia o no de otras proteínas.

10 PROCESO DE CENTRIFUGACIÓN, AJUSTE DE PH Y CONDUCTIVIDAD

Se determina el pH del SOBRENANDANTE PROTEICO, se ajusta el pH a 5.2 y la conductividad a 5.0 mS/cm, (si el valor está por debajo se ajusta con NaCl o diálisis si el valor está por encima).

15

TRATAMIENTO TÉRMICO

El SOBRENADANTE PROTEICO ajustado se somete a 30 a 60°C por 1 a 4 horas para la precipitación de los ácidos grasos.

20 El SOBRENADANTE PROTEICO ajustado es inmediatamente llevado a una temperatura de 0 a 10°C, luego se centrifuga igual que en los anteriores métodos y se descarta el precipitado de ACIDOS GRASOS, mientras el SOBRENADANTE PROTEICO ajustado y centrifugado se filtra por una membrana de 2 micras hasta se observe solución clara característica de una
25 concentración 20% a 50% mediada a A_{280} .

PROCESO DE PASTEURIZACIÓN

El SOBRENADANTE PROTEICO ajustado y centrifugado que fue concentrado hasta obtener un minino de 20% (w/v) mediante diálisis, se le agregan 0.026592g de CAPRILATO DE SODIO por gramo proteína, para una concentración final de 0.16 mmol por gramo proteína.

Ahora se somete a inactivación de virus, por el proceso de pasteurización a 50 a 90°C durante 0.5 a 10 horas, se vuelve a filtrar para lograr la esterilización y se empaca en solución salina de acuerdo con las necesidades del cliente. Etiquetando esta solución como solución proteica.

EVIDENCIA DE PUREZA

Análisis electroforético

Finalmente se analiza la solución proteica en SDS-PAGE. Se analiza la solución en electroforesis de plata:

Figura 1: Cromatografía de Exclusión. Pico a: Elusión de otras proteínas del plasma (control). Pico b: elusión de la Albúmina humana.

Figura 2: Electroforesis SDS-PAGE 10%, teñido con azul de coomasee. Carril 1: Marcador de Peso Molecular (G.I.B.). Carril 2: Albúmina humana eluida de la Cromatografía de exclusión.

Figura 3: Electroforesis SDS-PAGE 10%, teñido con Nitrato de Plata. Carril 1: Marcador Peso Molecular (G.I.B.). Carril 2: Fibrinógeno Humano Carril 3: Albúmina humana.

Figura 4: Análisis densitométrico de la Albúmina humana, teñida con azul de coomasee.

La pureza de la Albúmina también fue determinada por secuenciamiento, encontrándose en la banda de electroforesis solo una banda, clara indicación de la alta pureza, toda vez que el método de secuenciamiento puede determinar

una secuencia de un nanogramo de proteína, sin encontrarse ninguna secuencia cruzada en la banda de 5 microgramos de albúmina.

$1 \text{ nanogramo} / 5.000 \text{ nanogramos} \times 100 = 0.02\%$ o sea que las impurezas son menores al 0.02% y la pureza sería mayor o igual $100 - 0.02 = 99.98\%$.

5

10

15

20

25

FIGURAS

Figura 1.

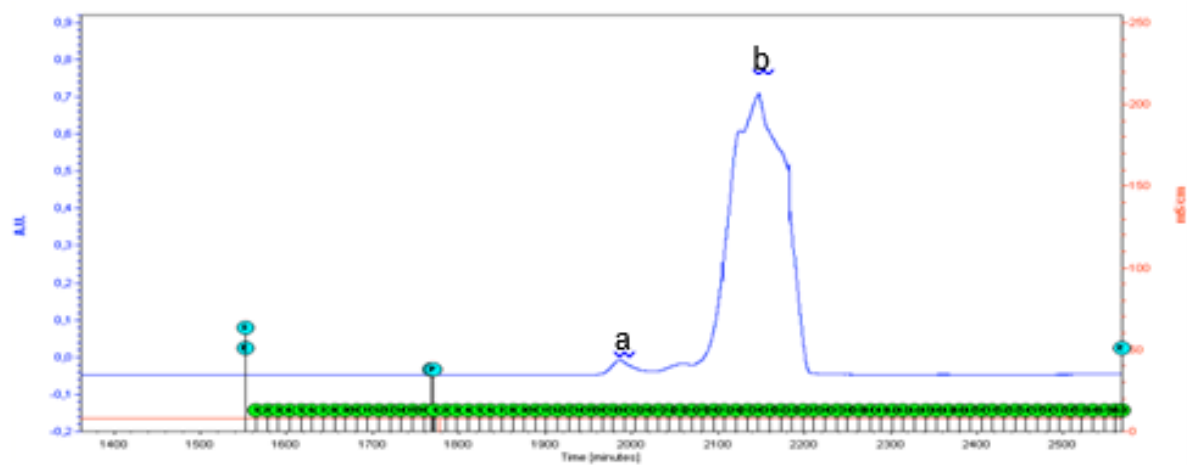
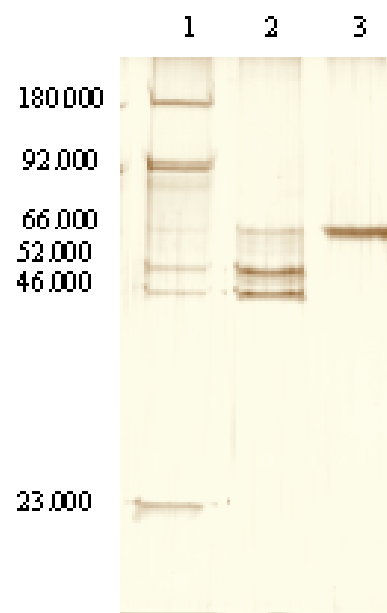


Figura 2.



Figura 3.**Figura 4.**