



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 220**

51 Int. Cl.:
B01D 15/38 (2006.01)
B01J 20/28 (2006.01)
B01J 20/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06794219 .3**
96 Fecha de presentación : **26.07.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1909938**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2008**

54 Título: **Método de cromatografía de afinidad de antitrombina III.**

30 Prioridad: **27.07.2005 FR 05 07986**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.04.2011

73 Titular/es: **AVENTIS PHARMA S.A.**
20, avenue Raymond Aron
92160 Antony, FR

72 Inventor/es: **Mourier, Pierre y**
Perret, Gérald

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 357 220 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

La presente invención tiene por objeto una columna de cromatografía de afinidad que comprende la proteína ATIII asociada a un soporte sólido.

5 Las heparinas, mezclas de mucopolisacáridos sulfatados de origen animal, son agentes biológicamente activos de la familia de los glicosaminoglicanos que tienen propiedades anticoagulantes particularmente útiles. Están constituidas por cadenas lineales polisacáridicas sulfatadas, muy heterogéneas con respecto a su tamaño. El peso medio de las heparinas es de aproximadamente 15000 Da (origen : mucus de cerdo).

10 Las heparinas de bajo peso molecular (HBPM) y las heparinas de muy bajo peso molecular (HMBPM) se preparan por corte de las cadenas polisacáridicas largas de heparina en cadenas más cortas de bajo peso molecular. Se entienden también por HBPM y HMBPM cadenas cuyo peso molecular está comprendido respectivamente entre 3000 y 6500 Da y entre 1500 y 3000 Da.

15 La Antitrombina III (ATIII) (Chandra et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80 : 1845-1848) es una serpina específica, que posee una débil actividad inhibidora de las serina proteasas que controlan la coagulación. Esta acción se ve nítidamente aumentada en presencia de heparina, que se enlaza y activa la ATIII. En particular, el enlace con la heparina implica un conjunto de cambios conformacionales en la proteína que culminan con la adopción de una conformación altamente favorable a la interacción con las serinas proteasas diana. Cuando la ATIII está en la conformación activada, la interacción con la molécula de heparina o derivada que ha iniciado el cambio en la conformación se ve nítidamente reforzada.

20 La interacción entre la heparina y la ATIII se debe a una secuencia pentasacáridica específica. Ahora bien, sólo un tercio de las hebras polisacáridicas poseen las secuencias específicas que permiten una interacción estable con la ATIII. Las preparaciones de heparina y derivados son, por tanto, heterogéneas en lo que se refiere a la afinidad por la ATIII. Es importante poder enriquecer una población de oligosacáridos en especies afines a la ATIII, siendo tal enriquecimiento susceptible de aumentar significativamente la actividad anticoagulación de esta población.

30 En el documento de Höök et al. (1976, FEBS Lett., 66 : 90-93) se describe un método de cromatografía de afinidad hacia ATIII para separar las fracciones afines y no afines de la heparina. 90-93). Se han publicado otros métodos, si bien repiten los puntos esenciales del método de Höök et al. (Hopwood et al., 1976, FEBS Lett., 69 : 51-54; Denton et al., 1981, Anal. Biol., 118: 388-391; Pixley & Danishefsky, 1982, Thromb. Res., 26 : 129-133). Según este método, la ATIII se fija covalentemente, en presencia de heparina acetilada, sobre la resina Sepharose B activada con CNBr. La utilización de heparina tiene como finalidad prevenir toda fijación covalente de la ATIII vía el sitio de enlace a la heparina.

Esta técnica tiene dos limitaciones importantes.

35 En primer lugar, la heparina utilizada para enlazarse a la ATIII es una heparina acetilada, de forma que se evita el riesgo de competición con los restos NH₂ de las hexaminas. Ahora bien, la acetilación de la heparina se traduce en una disminución importante de su afinidad y, por tanto, de su poder protector con respecto al sitio de enlace, de donde se deduce una disminución del número de moléculas de ATIII capaces de enlazarse con las especies afines.

40 Por otra parte, en vista de la concentración de ATIII utilizada (aproximadamente 7 mg de proteína/mL de resina hidratada), existe un fuerte riesgo de impedimento estérico entre las moléculas de polisacáridos susceptibles de enlazarse a la ATIII cuando se efectúa una purificación de especies afines hacia ATIII.

La presente invención tiene como objeto una columna de cromatografía de afinidad que comprende la proteína antitrombina III (ATIII) enlazada a un soporte sólido, caracterizada porque :

- a. la proteína ATIII es la proteína salvaje o una variante de ésta,
- 45 b. la proteína ATIII se ha activado previamente por incubación con una heparina de bajo peso molecular (HBPM) no modificada y rica en especies activas,
- c. la proteína ATIII está enlazada de forma covalente a una resina en una proporción inferior a aproximadamente 2 mg de proteína por mL de resina hidratada.

50 Se entiende por HBPM no modificada una HBPM que no ha sufrido modificación química ni enzimática después de su preparación y, en particular, que no está acetilada. Se entiende por HBPM rica en especies activas una HBPM rica en oligosacáridos afines hacia la ATIII.

Según la invención, se entiende por resina un soporte macromolecular químicamente inerte sobre el que se fija covalentemente la ATIII. Estos soportes comprenden, entre otros y de forma no limitante, bolas de

agarosa, poli(acrilamida) de agarosa, vidrio poroso, polivinilo o polimetacrilato, sobre los cuales se fija la ATIII covalentemente siguiendo las indicaciones de los fabricantes o métodos muy conocidos por los expertos en la materia, en particular los métodos de fijación covalente con bromuro de cianógeno e hidrazina. Se sobreentiende que pueden también utilizarse resinas preactivadas.

- 5 Según un modo muy particularmente ventajoso de realización de la invención, la resina utilizada es Sepharose y la técnica de fijación covalente utilizada es la de fijación covalente con bromuro de cianógeno.

La columna de cromatografía de afinidad según la invención presenta una doble ventaja.

- 10 Por una parte, la utilización de una HBPM no modificada para proteger el sitio de enlace de la ATIII permite fijar la proteína bajo una conformación activada. Bajo esta conformación, la ATIII presenta una afinidad significativamente más fuerte y más selectiva con respecto a especies afines que las ATIII enlazadas vía las aminas primarias sin activación previa.

- 15 Por otra parte, la baja concentración de ATIII permite interacciones con las especies afines sin impedimento estérico entre ellas. Esta propiedad de la invención es particularmente interesante cuando se busca separar especies de gran tamaño.

Para que todas las moléculas de ATIII sean activadas, es preferible utilizar una cantidad saturante de HBPM no modificada y rica en especies afines.

- 20 Según una forma de realización ventajosa de la invención, la razón entre las cantidades de sitios de enlace con la ATIII presentes en la HBPM y de moléculas de ATIII está comprendida entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15. Más precisamente, la invención tiene como objeto una columna de cromatografía de afinidad, tal como se ha definido anteriormente, caracterizada porque esta razón es de aproximadamente 10.

La invención tiene muy particularmente como objeto una columna de cromatografía de afinidad caracterizada porque para proteger el sitio de enlace de la ATIII se utiliza enoxaparina® como HBPM.

- 25 Como se ha explicado anteriormente, la invención presenta también la ventaja de permitir una mejor accesibilidad a la ATIII al manejar la concentración de proteína covalentemente fijable sobre la resina.

- 30 Según otra forma de realización ventajosa, la invención tiene como objeto una columna de cromatografía de afinidad caracterizada porque la razón ATIII/resina está comprendida entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1,5 mg de proteína por mL de resina. Por ejemplo, para una resina de tipo Sepharose B activada mediante bromuro de cianógeno (Sigma), dicha razón corresponde a una gama de aproximadamente 1,75 mg a 5,25 mg de proteína por g de resina seca (según los datos del proveedor, 1 g de resina seca da aproximadamente 3,5 mL de resina después de su hidratación).

Así, la columna de cromatografía de afinidad según la invención presenta una mayor capacidad y una mayor selectividad que las columnas descritas en el estado de la técnica.

- 35 Existen situaciones en las que se puede desear purificar especies afines a la ATIII a partir de una mezcla de especies afines y no afines. Se entiende por especie afín a la ATIII toda molécula susceptible de enlazarse específicamente a la ATIII. Por ejemplo, se puede querer enriquecer en especies afines una población de oligosacáridos heparínicos. También puede ser interesante, por ejemplo, aumentar la concentración de una disolución de anticuerpos policlonales contra ATIII.

- 40 Así, la columna de cromatografía de afinidad según la invención puede utilizarse para purificar especies afines hacia la ATIII a partir de una mezcla. Por tanto, la invención tiene también como objetivo un procedimiento de purificación de especies afines a la ATIII de una muestra que comprende especies afines y no afines a la ATIII, comprendiendo dicho procedimiento :

- 45 a. la introducción de dicha muestra en la columna de cromatografía de afinidad hacia la proteína ATIII, habiendo sido dicha columna previamente equilibrada con un tampón salino apropiado ;

b. el lavado de las especies no específicamente retenidas en dicha columna mediante un tampón salino de lavado apropiado ; y

c. la elución de las especies específicamente retenidas en dicha columna mediante un tampón salino de elución apropiado.

- 50 En particular, según un modo de realización muy particularmente ventajoso, las especies afines purificadas mediante el procedimiento según la invención son oligosacáridos constituyentes de las heparinas y sus derivados.

La elución de las diferentes especies puede seguirse, por ejemplo, mediante la medida de la absorbancia de las diferentes fracciones con la ayuda de un espectrofotómetro. La longitud de onda utilizada debe ser apropiada a la naturaleza de las especies purificadas. Por ejemplo, si se purifican oligosacáridos, la longitud de onda debe ser 232 nm; si se purifican proteínas, debe ser 280 nm.

- 5 La composición de las fracciones de elución se puede analizar seguidamente siguiendo métodos muy conocidos por el experto en la materia. Así, si las fracciones analizadas comprenden oligosacáridos, el experto en la técnica puede utilizar los métodos de análisis descritos en la técnica antecedente : por ejemplo, y de forma no limitante, electroforesis capilar, espectrometría de masas MALDI-TOF, cromatografía de líquidos de alta eficacia. El experto en la materia puede también utilizar un ensayo biológico, como el ensayo de inhibición del factor Xa.
- 10

Ejemplos

Los ejemplos siguientes ilustran la invención, no obstante, sin limitarla.

Leyendas de las figuras

- 15 Figura 1: cromatograma de una separación de enoxaparina® por cromatografía de afinidad a ATIII.

- 20 Figura 2: cromatograma de una separación de enoxaparina® por cromatografía de afinidad a ATIII. La curva 1 representa la inyección de la HBPM sobre la columna 1 (protección, enoxaparina®), la curva 2 la inyección del tampón sobre la columna 1 (protección, enoxaparina®), la curva 3 la inyección de la HBPM sobre la columna 2 (protección, heparina) y la curva 4 la inyección del tampón sobre la columna 2 (protección, heparina).

Ejemplo 1: Preparación y utilización de la columna

1. Preparación de la columna

- 25 Se reconstituyen 10 mg de ATIII en 2 mL de agua ppi y se recogen a continuación en 18 mL de tampón de acoplamiento (NaHCO₃ 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH=8), resultando una concentración final de 0,5 mg/mL (8,6 µM). Se añaden a la disolución 34,4 mg de enoxaparina® resultando una concentración final de 1,4 mg/mL (215 µM).

- 30 La disolución se mezcla en proporción 1 : 2 con la resina Sepharose B activada con CNBr (Sigma), preparada siguiendo las indicaciones del fabricante, agitándose a continuación suavemente y en frío durante toda la noche. Seguidamente, se transfiere el conjunto al tampón de bloqueo (volumen a volumen) y se agita durante 16 h.

Se vierte la resina en una columna XK16 termostatzada (Amersham) equipada con 2 pistones. Después de la decantación, se lava 4 a 5 veces alternando el tampón de bloqueo y el tampón de lavado.

Después de este lavado, se enjuaga abundantemente la columna con tampón Tris-HCl 10 M, pH = 7,4 ; NaCl 3M, para eliminar las moléculas de enoxaparina® complejadas con la ATIII.

- 35 Finalmente, se equilibra la columna con tampón Tris HCl 10 mM, pH = 7,4 ; NaCl 0,4 M.

2. Separación de las especies afines de la enoxaparina® por cromatografía de afinidad

Se inyecta en la columna una disolución de enoxaparina® con una concentración de 1 mg/mL en tampón Tris HCl 10 mM, pH = 7,4 ; NaCl 0,4 M. Se lava abundantemente la columna con el mismo tampón y a continuación se lleva a cabo la elución con tampón Tris HCl 10 mM, pH = 7,4 ; NaCl 3 M.

- 40 El comportamiento de las especies afines se sigue con un detector UV de serie de diodos (HP 1100), midiendo la absorbancia de las fracciones a 232 nm. Como se muestra en la fig. 1, las especies afines quedan específicamente retenidas en la columna y sólo son eluidas en presencia de NaCl 3M.

Ejemplo 2: Comparación con otra columna de cromatografía de afinidad

- 45 1. **Capacidad**

Se preparan dos columnas con un protocolo de fijación covalente idéntico, excepto el agente protector :

- Columna 1 : Protección con 40 mg de enoxaparina® cuando se efectúa la fijación covalente
- Columna 2 : Protección con 120 mg de heparina cuando se efectúa la fijación covalente

La diferencia de cantidad utilizada en la protección se justifica por la diferencia de masa molecular media (una proporción de aproximadamente 3,4).

5 Con el fin de determinar la capacidad de las columnas, se inyectan en cada columna 400 µg de una HBPM preparada según se describe en el ejemplo 7 de la solicitud de patente internacional WO 02/08295, en tampón Tris-HCl 10 mM pH = 7,4 ; NaCl 0,2 M con un flujo = 0,5 mL/min. La elución se efectúa con NaCl 3M.

10 La separación de las diferentes especies polisacáridicas se sigue con un detector UV de serie de diodos (HP 1100), midiendo la absorbancia de las fracciones a 232 nm.

En las dos columnas se observa separación, si bien el perfil de separación es diferente (Fig. 2). En particular, el pico de las especies no retenidas aparece ampliamente ensanchado en el caso de la columna 2 (protección: heparina). Además, la cantidad eluida en la columna 2 (protección : heparina) parece ser menor que la eluida en la columna 1 (protección : enoxaparina®).

15 Para verificar cuantitativamente este resultado cualitativo, se calcula el porcentaje de especies retenidas mediante la integración de las áreas correspondientes, efectuada con el programa HP Chemstation® según la fórmula :

% Especies retenidas = área del pico de elución / (área del pico de las especies no retenidas + área del pico de las especies retenidas)

20 Sabiendo que el porcentaje de especies afines en una fracción hexasacáridica de la HBPM utilizada se estima en 22-24 %, se ha efectuado una determinación aproximada de la capacidad haciendo variar la cantidad inyectada. La capacidad corresponde, por tanto, a la cantidad máxima de HBPM inyectada para la que se obtiene este porcentaje de 22-24 % con la elución.

25 Así, se ha encontrado que la capacidad de la columna 1 (protección : enoxaparina) es de 115,8 µg y que la capacidad de la columna 2 (protección : heparina) es de 64 µg.

Selectividad

En este documento, se define como selectividad la capacidad de las resinas para diferenciar durante la separación las especies polisacáridicas afines de las no afines.

30 Para llevar a cabo estos análisis se han efectuado inyecciones de HBPM en cantidad inferior a la capacidad anteriormente determinada.

a. Columna 1 (protección : enoxaparina®).

35 Después de varias inyecciones de 427 µg de HBPM, se han reunido las fracciones afines y las no afines, y se han analizado mediante CLHP CTA-SAX (MOURIER et al., 2004, Anal. Biochem., 332 : 299-313). La fracción afín obtenida es pura y completa en el sentido de que no contiene especies no afines y de que representa la totalidad de los hexasacáridos afines. La fracción no afín está, de forma complementaria, totalmente desprovista de especies afines.

Para confirmar el análisis estructural, se han determinado las actividades anti-Xa de las fracciones afines y de las no afines separadas en la columna 1 (protección : enoxaparina®).

40 La actividad de la fracción afín es igual a 818 ± 10 UI/mg ; a efectos comparativos, la actividad del hexasacárido Δ UA-(1→4)α-GlcNAc(6S)-(1→4)β-GlcA-(1→4)α-GlcNS(NS,3,6S)-(1→4)β-IdA2S-(1→4)α-GlcNS(NS,6S) es de aproximadamente 650-700 UI/mg. En contraste, ha sido totalmente imposible detectar una actividad anti-Xa en las fracciones no afines.

Los análisis biológicos efectuados en las fracciones están, por tanto, en perfecto acuerdo con los análisis estructurales.

45 b. Columna 2 (protección : heparina).

Se ha llevado a cabo un estudio similar para la columna 2 (protección : heparina). Con el fin de optimizar el funcionamiento de esta resina, las cantidades inyectadas han sido, sin embargo, menores (60 µg) con respecto a la capacidad previamente determinada.

5 La fracción afín no es tan pura como la obtenida con la columna 1 (protección : enoxaparina®). Se observa, en efecto, la presencia de hexasacáridos no afines, en particular de hexasacáridos muy sulfatados, tales como $\Delta\text{UA}2\text{S}-(1\rightarrow4)\alpha\text{-GlcNS}(\text{NS},6\text{S})-(1\rightarrow4)\beta\text{-IdA}2\text{S}-(1\rightarrow4)\alpha\text{-GlcNS}(\text{NS},6\text{S})-(1\rightarrow4)\beta\text{-IdA}2\text{S}-(1\rightarrow4)\alpha\text{-GlcNS}(\text{NS},6\text{S})$ ó $\Delta\text{UA}2\text{S}-(1\rightarrow4)\alpha\text{-GlcNS}(\text{NS},6\text{S})-(1\rightarrow4)\beta\text{-IdA}2\text{S}-(1\rightarrow4)\alpha\text{-GlcNS}(\text{NS},6\text{S})-(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcA}-(1\rightarrow4)\alpha\text{-GlcNS}(\text{NS},6\text{S})$, en cantidad no despreciable.

Además, se encuentran en la fracción no afín especies afines, en particular la especie afín mayoritaria : $\Delta\text{UA}-(1\rightarrow4)\alpha\text{-GlcNAc}(6\text{S})-(1\rightarrow4)\beta\text{-GlcA}-(1\rightarrow4)\alpha\text{-GlcNS}(\text{NS},3,6\text{S})-(1\rightarrow4)\beta\text{-IdA}2\text{S}-(1\rightarrow4)\alpha\text{-GlcNS}(\text{NS},6\text{S})$.

10 Las titulaciones de las actividades anti-Xa de las fracciones afines y no afines confirman los análisis estructurales. En efecto, las fracciones afines presentan una actividad anti-Xa que es de solamente 565 ± 45 UI/mg. Además, se observa una actividad residual no despreciable, de aproximadamente 15 UI/mg, en la fracción no afín. Esta actividad es el reflejo de las especies afines residuales en la fracción no afín, puestas de manifiesto en el análisis estructural.

Por tanto, es evidente que la selectividad de la columna 1 (enoxaparina ®) es superior a la de la columna 2 (heparina).

REIVINDICACIONES

1. Una columna de cromatografía de actividad que comprende la proteína antitrombina III (ATIII) enlazada a un soporte sólido, caracterizada porque :
- 5
- a. la proteína ATIII es la proteína salvaje o una variante de ésta,
 - b. la proteína ATIII se ha activado previamente por incubación con una heparina de bajo peso molecular (HBPM) no modificada y rica en especies activas,
 - c. la proteína ATIII está enlazada de forma covalente a una resina en una proporción inferior a aproximadamente 2 mg de proteína por mL de resina hidratada.
- 10
2. Una columna tal como se ha definido en la reivindicación 1, caracterizada porque la razón entre las cantidades de sitios de enlace con la ATIII presentes en la HBPM y de moléculas de ATIII está comprendida entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15.
3. Una columna tal como se ha definido en la reivindicación 2, caracterizada porque dicha razón es de aproximadamente 10.
4. Una columna tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la HBPM es la enoxaparina®.
- 15
5. Una columna tal como se ha definido en la reivindicación 1, caracterizada porque la razón ATIII/resina está comprendida entre 0,5 y 1,5 mg de proteína por mL de resina.
6. Un procedimiento de purificación de las especies afines a la ATIII contenidas en una muestra que comprende especies afines y no afines a la ATIII, comprendiendo dicho procedimiento :
- 20
- a. la introducción de dicha muestra en la columna de cromatografía de afinidad según la reivindicación 1, habiendo sido dicha columna previamente equilibrada con un tampón salino apropiado ;
 - b. el lavado de las especies no específicamente retenidas en dicha columna mediante un tampón salino de lavado apropiado ; y
 - c. la elución de las especies específicamente retenidas en dicha columna mediante un tampón salino de elución apropiado.
- 25
7. Un procedimiento de purificación de las especies afines a la ATIII según la reivindicación 6, caracterizado porque dichas especies son oligosacáridos.

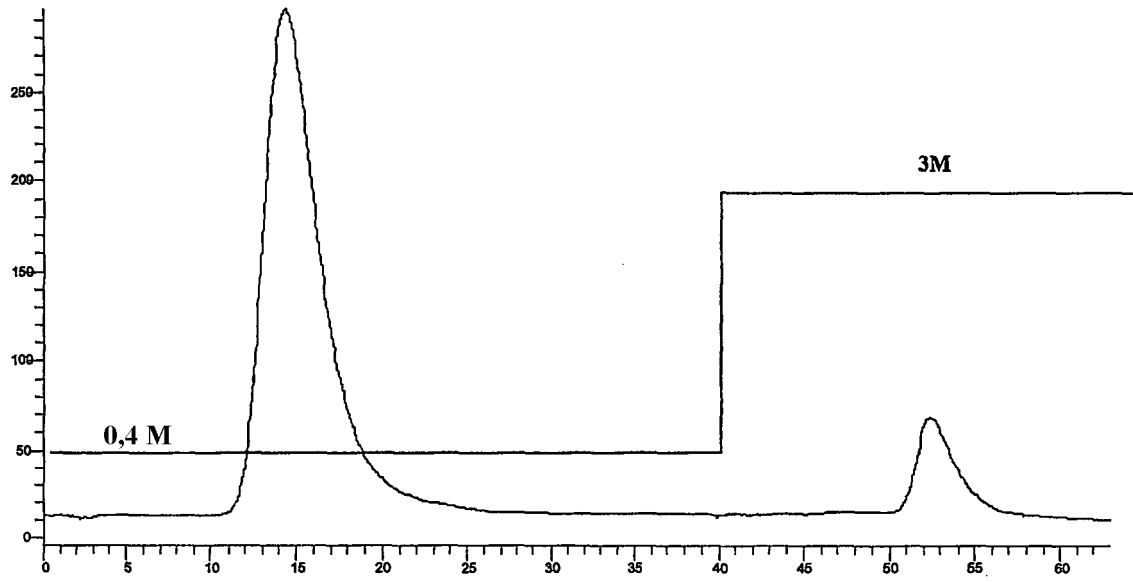


Figura 1

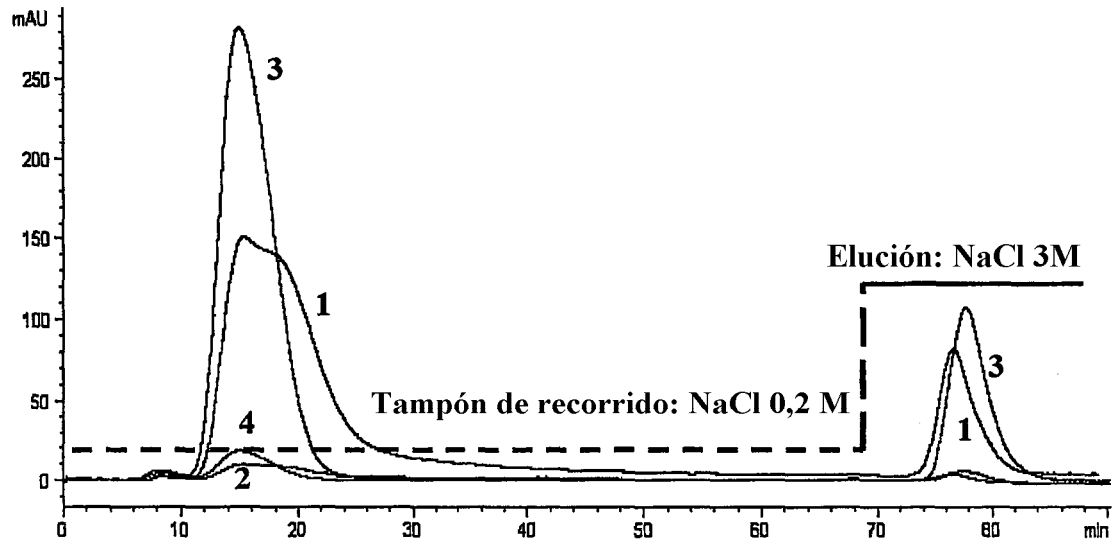


Figura 2