



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 492**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01942635 .2**

96 Fecha de presentación : **18.01.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1248796**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2002**

54 Título: **Procedimiento para la purificación de antitrombina-III.**

30 Prioridad: **21.01.2000 SE 0000178**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.06.2011

73 Titular/es: **OCTAPHARMA AG.**
Seidenstrasse 2
8853 Lachen, CH

72 Inventor/es: **Winge, Stefan**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 361 492 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

Procedimiento para la purificación de antitrombina-III

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a procedimientos para separar las isoformas AT-III de glicoproteína rica en histidina (HRGP).

Técnica antecedente

10 La antitrombina III (AT-III) es una glicoproteína del plasma que inhibe las serina proteasas en la cascada de coagulación y, de esta manera, desempeña un papel fundamental en la regulación de la coagulación sanguínea. La antitrombina III es un inhibidor de los factores IXa, Xa, XI, XIIa y trombina. De esta manera, AT-III regula la formación de coágulos en diferentes fases de la cascada de coagulación. Una pequeña disminución del contenido de AT-III en la sangre está asociada con un aumento del riesgo de tromboembolia. Se usan concentrados de AT-III en la profilaxis y tratamiento de trastornos tromboembólicos en pacientes con deficiencia de antitrombina adquirida o hereditaria. Además, se ha informado de que AT-III está implicada en muchas otras respuestas biológicas, por ejemplo angiogénesis y respuestas inflamatorias. La función de AT-III en estos mecanismos aún no se entiende completamente.

15 La purificación de AT-III por cromatografía de afinidad, usando heparina como ligando de unión en fase sólida, se conoce en la técnica. Miller-Andersson y col. (Thrombosis Research 5, 439-452, 1974) desvelan el uso de heparina-Sepharose para purificar AT-III humana. Todo el procedimiento, que incluye intercambio de iones y cromatografía de filtración en gel, proporcionaba un rendimiento del 34 %.

20 En plasma humano, la antitrombina III existe como al menos dos entidades moleculares, que son homólogas de acuerdo con la composición de aminoácidos, aunque difieren en el contenido de carbohidrato y en su comportamiento de unión a heparina. Una variante de antitrombina, denominada AT-III β , se aisló del plasma humano, independientemente de la especie de antitrombina predominante (denominada AT-III α), gracias a su fuerte unión a la matriz de heparina-Sepharose a potencias iónicas altas (Peterson, C.B. & Blackburn, M.N. (1985) J. Biol. Chem. 260, 610-615).

30 Los pesos moleculares determinados fueron 59.800 y 56.900 para AT-III α y AT-III β humanas, respectivamente. La diferencia en los pesos moleculares de las dos antitrombinas se atribuyó a una reducción de aproximadamente el 25-30 % en el contenido de ácido siálico, azúcar neutro y amino azúcar en AT-III β , si se compara con el contenido de carbohidrato de la subespecie AT-III α (Peterson & Blackburn, *supra*). Se ha demostrado que AT-III β carece de uno de las cuatro cadenas laterales de oligosacárido, en concreto la cadena lateral en asparagina 135 (Brennan, S.O. y col. (1987) FEBS Letters 219, 431-436). La forma AT-III α está cargada más negativamente que AT-III β ; se ha demostrado que AT-III α y AT-III β tienen una pI:s de 4,9 y 5,1, respectivamente (Frebelius, S. y col. (1996) Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 16:1292-1297).

35 Es deseable obtener AT-III β pura, puesto que esta forma tiene efectos específicos sobre la coagulación en la pared del vaso. Se ha demostrado que AT-III β puede evitar la reestenosis de aorta de conejo después de una lesión con globo (Swedenborg (1998) Blood Coagulation and Fibrinolysis 9 (supl. 3): S7-S10). Por lo tanto, puede considerarse AT-III β como un fármaco potencial para seres humanos en la profilaxis de la reestenosis cuando se realiza dilatación con de la aorta con un globo.

40 La glicoproteína rica en histidina (HRGP) es una proteína del plasma monocatenaria, aislada originalmente en 1972. La función fisiológica exacta de HRGP aún es desconocida. Debido a la interacción con heparina, fibrinógeno y fibrina, plasminógeno y plaquetas activadas, se considera que la HRGP es un modulador de la coagulación y fibrinólisis (Koide, T. En: Fibrinolysis: Current Prospects. Gaffney, PJ (Ed.), John Libbey & Co., Londres 1988, pág. 55-63). La cadena polipeptídica consiste en 507 restos de aminoácido y contiene regiones que comparten homología con otras proteínas del plasma, por ejemplo antitrombina-III (Koide, T. y col. (1986) Biochemistry 25, 2220-2225).

45 Weitzhandler y col. desarrollaron envases de columna de intercambio de cationes que están basados en un soporte polimérico pelicular, revestido, hidrófilo con una química superficial tentacular artesana, que se aplicó para la separación de citocromo C y variantes de hemoglobina (Weitzhandler y col., Journal of Chromatography A 828, 365-372).

50 Un procedimiento para la preparación de AT-III a partir de plasma sanguíneo se describió en el documento US 5.116.962, que está basado en el uso de un polisacárido sulfatado oxidado, unido a un material de soporte que tiene grupos amino.

Como se ha indicado anteriormente, la implicación completa de las dos isoformas de AT-III y HRGP en el cuerpo aún no se entiende completamente. En consecuencia, es deseable proporcionar procedimientos de purificación eficaces para producir las proteínas en forma pura, que facilitará estudios *in vivo* e *in vitro*.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un enfoque isoeléctrico de muestras de proteína recogidas durante procedimientos de acuerdo con la invención (Ejemplo 1) o el procedimiento para comparación (Ejemplo 2).

Gel A

- 5 1 Concentrado UF1 (Ejemplo 1, etapa 2)
 2 Fracción A1 (Ejemplo 1, etapa 2)
 3 Fracción B1 (Ejemplo 1, etapa 2)
 4 -
 5 Fracción A2 (Ejemplo 1, etapa 3)
 10 6 Fracción de lavado entre A2 y B2 (Ejemplo 1, etapa 3)
 7 Fracción B2 (Ejemplo 1, etapa 3)
 8 Material eluido del gel con NaCl 1 M (Ejemplo 1, etapa 3)

Gel B

- 15 1 Fracciones combinadas B1 y B2 (Ejemplo 1, etapa 4)
 2 Material eluido a una potencia iónica baja (Ejemplo 1, etapa 4)
 3 Fracción B3 (primera parte del pico de elución) (Ejemplo 1, etapa 4)
 4 Fracción B3 (última parte del pico de elución) (Ejemplo 1, etapa 4)
 5 Fracción A2 (Ejemplo 1, etapa 3)
 6 Fracción B3 (Ejemplo 1, etapa 4)
 20 7 Fracción D (Ejemplo 2)
 8 Fracción E (Ejemplo 2)

La Figura 2 es una comparación de los cromatogramas obtenidos a partir de (A) purificación de AT-III α mediante cromatografía de intercambio de cationes de acuerdo con el Ejemplo 2 (Fracción A2); y (B) purificación de AT-III β mediante cromatografía con heparina-Sepharose de acuerdo con procedimientos conocidos (Fracción D).

Divulgación de la invención

Se ha demostrado, sorprendentemente, que un gel de intercambio de cationes de tipo "tentáculo", en el que los grupos intercambiadores de cationes están fijados a la matriz del gel a través de una cadena polimérica lineal, pueden usarse ventajosamente para la separación de glicoproteína rica en histidina (HRGP) de antitrombina. Dicho gel de intercambio de cationes puede usarse convenientemente para la purificación, por ejemplo, mediante cromatografía en columna de HRGP.

La divulgación de la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de una solución que comprende antitrombina-III (AT-III) sustancialmente pura, o una isoforma de la misma, comprendiendo dicho procedimiento el uso de un gel de intercambio de cationes, en el que el grupo intercambiador de cationes está fijado a la matriz del gel a través de una cadena polimérica lineal.

Se desvela adicionalmente mediante la invención un procedimiento para la preparación de una solución que comprende antitrombina-III (AT-III) sustancialmente pura, que comprende las etapas de

- (i) preparar una solución que comprende principalmente AT-III y glicoproteína rica en histidina (HRGP);
 (ii) poner en contacto dicha solución con un gel de intercambio de cationes, en el que el grupo intercambiador de cationes está fijado a la matriz del gel mediante una cadena polimérica lineal, en condiciones en las que AT-III puede eluirse del gel a una potencia iónica baja, mientras que HRGP está fijada al gel a una potencia iónica baja; y
 (iii) eluir, en condiciones de potencia iónica baja y recoger una fracción de proteína, obteniendo de esta manera una solución que comprende AT-III sustancialmente pura.

La solución que comprende principalmente AT-III y glicoproteína rica en histidina (HRGP) puede prepararse, convenientemente, de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Un procedimiento adecuado podría incluir, por ejemplo, las etapas de:

- (i) preparar un sobrenadante de la Fracción I de Cohn a partir de plasma humano por procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, Cohn y col. (1946) J. Am. Chem. Soc. 68, 459-475)
 (ii) poner en contacto dicho sobrenadante de la Fracción I de Cohn con un gel de afinidad capaz de unir AT-III y HRGP (véase, por ejemplo, Koide, T. y col. (1985) J. Biochem. 98, 1191-1200);
 (iii) eluir y recoger la fracción de proteína unida a dicha matriz de afinidad.

Dicho gel de afinidad preferentemente comprende heparina como el ligando de afinidad. Los gels de afinidad adecuados incluyen heparina-Sepharose® (Amersham Pharmacia); HeparinHyperD (Biosepra), Fractogel TSK AF-

Heparin 650 (Merck), Heparin-Agarose (Sigma), TSKgel Heparin (Tosohaas), Heparin-Agarose 6XL (ACL).

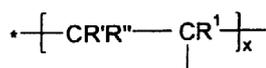
5 Dicha etapa de intercambio de cationes se realiza mediante cromatografía de adsorción, preferentemente por cromatografía en columna. En la cromatografía de intercambio de iones, las sustancias cargadas se separan mediante materiales de columna que llevan una carga opuesta (véase, por ejemplo, Scopes, R.K. Protein Purification, Principles and Practice, tercera edición, Springer-Verlag 1993). Los grupos iónicos de las columnas de intercambio están unidos covalentemente a la matriz de gel, y están compensados por pequeñas concentraciones de contraiones que están presentes en el tampón. Cuando se añade una muestra a la columna, tiene lugar un intercambio con los contraiones unidos débilmente.

10 Como sabe bien la persona experta, la cromatografía usa el hecho de que las proteínas son aniones o cationes multivalentes. Debido a la carga total (carga neta) de las proteínas, es posible unir las a una fase estacionaria cargada, siempre y cuando la concentración de sal se mantenga baja. Los ingredientes de sal son el medio más común para eluir proteínas de los intercambiadores de iones. Las concentraciones de sal excesivamente altas provocan que la protección de las cargas en la superficie de la proteína y la unión eficaz a un intercambiador no pueda tener lugar nunca más. Puesto que las proteínas unidas se desplazan posteriormente con ayuda de un gradiente de sal en aumento, pueden separarse proteínas que varían en carga. La acción de las sales puede considerarse en una de dos maneras. La sal puede desplazar directamente la proteína; los iones ocupan los sitios cargados y bloquean la re-fijación mediante proteína. Como alternativa, el sistema puede considerarse como un equilibrio en el que incluso las proteínas unidas fuertemente pasan algún tiempo estando no adsorbidas; la presencia de los iones de sal entre la proteína no fijada y el adsorbente debilita la atracción entre ambos. En cualquier caso, las proteínas desorbidas se reemplazan por contraiones. La elución de las proteínas puede realizarse mediante concentraciones de sal gradualmente mayores o mediante gradientes de sal lineales o no lineales.

25 Como se ha mencionado anteriormente, el gel de intercambio de cationes a usar de acuerdo con la invención comprende una cadena polimérica lineal, injertada sobre la superficie de soporte, que sirve como un espaciador o "tentáculo" que posibilita que los grupos iónicos funcionales adopten una configuración que es óptima para su interacción con la proteína durante la cromatografía. Dichos intercambiadores de iones de "tentáculo" se han descrito, por ejemplo, en Müller, W. (1990) J. Chromatography 510, 133-140; Ditz, R. y col. (1991) Australian J. Biotechnol. 5, 101-102; y Donovan, J. y col. (1991) Am. Biotechnol. Lab. 9, 20-22.

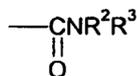
30 Las "cadenas poliméricas lineales" adecuadas incluyen en particular aquellas incluidas en los materiales de separación desvelados en el documento US 5.453.186 (Müller y col.). Dicha patente desvela un material de separación que comprende un soporte que contiene un grupo hidroxilo alifático primario o secundario revestido con al menos un polímero unido covalentemente, en el que

- 35 (1) los polímeros unidos covalentemente están unidos al soporte mediante polimerización de injerto a través de los átomos de carbono α de los grupos hidroxilo, y
 (2) el polímero contiene unidades repetidas, iguales o diferentes, de fórmula

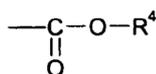


en la que R^1 es H o CH_3 ;

Y es



40 o



cada uno de R^1 y R'' es independientemente H o CH_3 ,

cada uno de R^2 y R^3 es independientemente

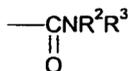
- 45 (a) alquilo C_{1-10} , fenilo, fenil-alquilo C_{1-10} , cicloalquilo, alquil C_{12-10} -cicloalquilo o alquil C_{1-10} fenilo,
 (b) uno de los grupos anteriores en (a) está monosustituido o polisustituido con cada uno de amino, mono- o dialquilamino, trialquilamino, carboxilo o sulfonilo,
 (c) un radical cíclico o bicíclico que tiene 5-10 átomos de C, en el que uno o más grupos CH o CH_2 está reemplazado por (i) N o NH, (ii) N o NH y S, o (iii) N o NH y O, o

(d) uno de R² o R³ es H;

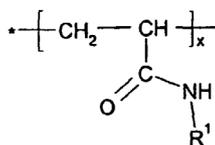
y en la que R² y R³ están coordinados entre sí, de manera que ambos radicales son ácidos o básicos, o uno de los radicales es neutro y uno es ácido o básico,

- 5 x es de 2 a 100,
y R⁴ es alquilo C₁₋₁₀, fenilo, fenil-alquilo C₁₋₁₀, cicloalquilo o alquil C₁₋₁₀-cicloalquilo o ciclofenilo C₁₋₁₀, cada uno monosustituido o polisustituido con carboxilo o sulfonilo.

Para el fin de la presente invención, los materiales de separación particularmente preferidos incluyen aquellos descritos en el documento US 5.453.186, en el que R¹ y R² son H, R¹ es H e Y es



- 10 en la que R² es H y R³ es alquilo C₁₋₁₀, por ejemplo isobutilo, sustituido con un grupo funcional, por ejemplo sulfonilo. En consecuencia, dicha cadena polimérica lineal consiste preferentemente en unidades repetidas de la fórmula



en la que x es de 2 a 100; y R¹ es alquilo C₁₋₁₀ ramificado o no ramificado, por ejemplo isobutilo, estando dicho alquilo sustituido con un grupo intercambiador de iones ácido fuerte, tal como sulfonilo.

- 15 En una realización preferida de la presente invención, dicho intercambiador de cationes es un intercambiador de cationes fuertemente ácido que tiene, por ejemplo, un grupo sulfónico como su grupo funcional. Otros posibles grupos funcionales incluyen carboximetilo (CM). Un gel de intercambio de cationes preferido es Fractogel® EMD SO3-650 (M) (Merck, Darmstadt, Alemania) en el que el grupo sulfónico funcional está acoplado en la matriz del gel mediante un brazo espaciador de "tentáculo" hidrófobo que comprende unidades sulfoisobutilacrilamida. La longitud
20 media de las cadenas poliméricas es de 15 a 50 unidades monoméricas, que llevan el mismo número de ligandos de la cadena secundaria.

- Como se muestra en el Ejemplo 1, Etapa 2 a continuación, la AT-III puede separarse convenientemente de la HRGP y, de esta manera, purificarse por el procedimiento como se ha definido anteriormente. En un aspecto adicional, este procedimiento incluye la separación y purificación de las isoformas de AT-III, AT-III α y AT-III β . Una solución de
25 proteína que comprende principalmente AT-III α puede obtenerse recogiendo una fracción de proteína, que es la primera de las dos fracciones de proteína principales que eluyen del gel en condiciones de potencia iónica baja. Una solución de proteína que comprende principalmente AT-III β puede obtenerse recogiendo una fracción de proteína, que es la última de las dos fracciones de proteína principales que eluyen del gel en condiciones de tensión iónica baja. En el ejemplo a continuación, se han mostrado tiempos de retención de 8 y 104 minutos para AT-III α y AT-III β ,
30 respectivamente. Sin embargo, el experto entenderá que el tiempo de retención dependerá de numerosos factores, tales como el pH y la fuerza iónica del tampón de elución, temperatura, dimensiones de la columna, carga proteica y caudal. La información general sobre el efecto de los diversos parámetros puede encontrarse en libros de texto sobre purificación de proteínas, tal como el de Scopes (*supra*).

- En el presente contexto la expresión "condiciones de potencia iónica baja" implica usar un tampón de elución que
35 tiene una conductividad a temperatura ambiente de 0,1 a 6 mS/cm, preferentemente de 1 a 4 mS/cm y más preferentemente de 2 a 3 mS/cm, tal como aproximadamente 2,6 mS/cm. Un tampón adecuado podría comprender, por ejemplo, citrato sódico, acetato sódico, fosfato sódico, Tris (base) o fosfato potásico, solo o en combinación con otras sales, tales como cloruro sódico, a una concentración de 1 a 20 mM, tal como aproximadamente 10 mM. La etapa de intercambio de cationes se realiza preferentemente a pH neutro, más específicamente a un pH de 6,5 a 8,
40 preferentemente de aproximadamente 7,5.

- La invención proporciona un procedimiento para la preparación de una solución que comprende glicoproteína rica en histidina (HRGP) sustancialmente pura, que comprende eluir, en condiciones de potencia iónica media o alta, y recoger la fracción de proteína fijada al gel de intercambio de cationes durante la etapa (ii) como se ha definido anteriormente. La elución de HRGP se realiza preferentemente al mismo pH que el usado durante la elución de AT-III.
45

- Para el fin de la presente descripción, la expresión "condiciones de potencia iónica media" implica el uso de un tampón de elución que tiene una conductividad a temperatura ambiente de 4 a 16 mS/cm. La expresión "condiciones de potencia iónica alta" implica usar un tampón de elución que tiene una conductividad a temperatura ambiente de 10 a 450 mS/cm. En ambos casos, un tampón adecuado podría comprender, por ejemplo, citrato sódico, acetato
50 sódico, fosfato sódico, Tris (base) o fosfato potásico, solo o en combinación con otras sales, tales como cloruro

sódico, a una concentración de 1 mM a 2 M.

5 Para eluir la fracción de proteína que comprende HRGP, la expresión "condiciones de potencia iónica media o alta" implica, por tanto, el uso de un tampón de elución que tiene una conductividad a temperatura ambiente de 4 a 450 mS/cm o de 10 a 450 mS/cm, preferentemente de 50 a 150 mS/cm y más preferentemente de 80 a 110 mS/cm, tal como aproximadamente 106 mS/cm. Como se muestra en el Ejemplo 1, etapa 2 a continuación, HRGP podría eluirse con un tampón que comprende citrato sódico 10 mM y NaCl 1 M.

En otro aspecto más, esta divulgación proporciona un procedimiento para la preparación de una solución que comprende una isoforma purificada de AT-III, que comprende las etapas de

- 10 (i) preparar una solución que comprende AT-III purificada o sustancialmente pura;
- (ii) poner en contacto dicha solución de proteína con un gel de intercambio de cationes en el que el grupo intercambiador de cationes está fijado a la matriz de gel a través de una cadena polimérica lineal, en condiciones en las que la AT-III α puede eluirse del gel a un potencia iónica baja, mientras que la AT-III β está fijada al gel en condiciones de potencia iónica baja; y
- 15 (iii) eluir en condiciones de potencia iónica baja y recoger una fracción de proteína, obteniendo de esta manera una solución que comprende AT-III α sustancialmente pura; y/o
- (iv) eluir, en condiciones de potencia iónica media o alta y recoger una fracción de proteína, obteniendo de esta manera una solución que comprende AT-III β .

20 El material de partida, es decir, la solución que comprende AT-III purificada, podría ser ventajosamente una solución que comprende AT-III sustancialmente pura, preparada de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente. La etapa de intercambio de cationes se realiza preferentemente a un pH de 6,5 a 7,25, más preferentemente de aproximadamente 6,75.

25 Las expresiones "condiciones de potencia iónica baja", "condiciones de potencia iónica media" y "condiciones de potencia iónica alta" se han definido anteriormente. Para eluir la fracción de proteína que comprende AT-III β , la expresión "condiciones de potencia iónica media o alta" implica, por tanto, usar un tampón de elución que tiene una conductividad a temperatura ambiente de 4 a 450 mS/cm, preferentemente de 4 a 30 mS/cm y, más preferentemente, de 4 a 16 mS/cm o de 10 a 16 mS/cm, tal como aproximadamente 13 mS/cm. Como se muestra en el Ejemplo 1, etapa 3 a continuación, AT-III β podría eluirse con un tampón que comprende citrato sódico 10 mM y NaCl 0,5 M.

30 En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un procedimiento para la preparación de una solución que comprende AT-III β sustancialmente pura, que comprende las etapas de

- (i) preparar, de acuerdo con uno cualquiera (solo o en combinación) de los procedimientos de la invención como se ha descrito anteriormente, una solución que comprende AT-III β ;
- (ii) poner en contacto dicha solución con un gel de intercambio de cationes en el que el grupo intercambiador de cationes está fijado a la matriz de gel a través de una cadena polimérica lineal, en condiciones en las que la AT-III α puede eluirse del gel a un potencia iónica baja o media, mientras que la AT-III β está fijada al gel a una potencia iónica baja o media; y
- 35 (iii) eluir, en condiciones de potencia iónica baja y/o media, una fracción de proteína, eluyendo de esta manera la AT-III α de la columna; y
- (iv) eluir, en condiciones de potencia iónica alta, y recoger una fracción de proteína, obteniendo de esta manera
- 40 una solución que comprende AT-III β .

La etapa de intercambio de cationes se realiza preferentemente a un pH de 6,75 a 7,25, más preferentemente de aproximadamente 7,0.

45 El experto en la materia entenderá que la solución de partida puede tener que tratarse de una manera adecuada antes de poner en contacto dicha solución con un gel de intercambio de cationes. Es normal que la mezcla de proteína aplicada esté en el mismo tampón usado para equilibrar la columna. Adicionalmente, el pH y la potencia iónica deberían ser similares o idénticos a los del tampón en la columna. Hay dos maneras habituales de alcanzar la composición de tampón correcta: diálisis o filtración en gel (véase, por ejemplo, Scopes, R.K. Protein Purification, Principles and Practice, tercera edición, Springer-Verlag 1993). Como alternativa, puede conseguirse una conductividad adecuada por dilución con agua destilada, como en el Ejemplo 1, etapa 4 a continuación. Puede obtenerse un valor de pH adecuado mediante adición de una base, tal como hidróxido sódico o un ácido, tal como ácido cítrico.

50

Las expresiones "condiciones de potencia iónica baja", "condiciones de potencia iónica media" y "condiciones de potencia iónica alta" se han definido anteriormente. Para eluir la fracción de proteína que comprende AT-III α , la expresión "condiciones de potencia iónica media" implica usar un tampón de elución que tiene una conductividad a temperatura ambiente de 4 a 16 mS/cm, preferentemente de 5 a 10 mS/cm, tal como aproximadamente 7 mS/cm. Como se muestra en el Ejemplo 1, etapa 4 a continuación, pueden eluirse cantidades traza de AT-III α con un tampón que comprende citrato sódico 10 mM, opcionalmente NaCl 0,08 M para obtener posteriormente AT-III β pura.

55

Para eluir la fracción de proteína que comprende AT-III β , la expresión “condiciones de potencia iónica alta” implica usa un tampón de elución que tiene una conductividad a temperatura ambiente de 10 a 450 mS/cm, preferentemente de 50 a 150 mS/cm y más preferentemente de 80 a 110 mS/cm, tal como aproximadamente 106 mS/cm. Como se muestra en el Ejemplo 1, etapa 4 a continuación, AT-III β podría eluirse con un tampón que comprende citrato sódico 10 mM y NaCl 1 M.

Las preparaciones de antitrombina producidas son adecuadas como ingredientes farmacéuticamente eficaces en composiciones y combinaciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, opcionalmente, ingredientes activos adicionales, tales como anticoagulantes como hirudina o heparina, o agentes trombolíticos, tales como activador de plasminógeno o hementina. Las preparaciones de antitrombina producidas de acuerdo con la invención pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con cualquier ácido orgánico o inorgánico no tóxico.

La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” significa una carga, diluyente o material de encapsulación inerte, no tóxico, sólido o líquido, que no reacciona adversamente con el compuesto activo o con el paciente. Los vehículos líquidos adecuados preferentes se conocen bien en la técnica, tales como agua estéril, solución salina, dextrosa acuosa, soluciones de azúcar, etanol, glicoles y aceites, incluyendo aquellos del petróleo o de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de soja y aceite mineral.

El término “parenteral” incluye en el presente documento inyección subcutánea, intravenosa, intra-articular e intratraqueal y técnicas de infusión. También son adecuadas otras administraciones, tales como administración oral y aplicación tópica. Las composiciones y composiciones parenterales se administran más preferentemente por vía intravenosa, en lugar de en forma de bolo o como una fusión constante de acuerdo con procedimientos conocidos. Los comprimidos y cápsulas para administración oral contienen excipientes convencionales, tales como agentes aglutinantes, cargas, diluyentes, agentes de formación de comprimidos, lubricantes, disgregantes y agentes humectantes. Los comprimidos pueden recubrirse de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica.

Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse en forma de un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales como agentes de suspensión, agentes de emulsión, vehículos no acuosos y conservantes. Las aplicaciones tópicas pueden estar en forma de suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jaleas o preferentemente pomadas en emulsión.

Las dosis unitarias de acuerdo con la invención pueden contener las cantidades diarias requeridas de la proteína de acuerdo con la invención, o sub-múltiplos de las mismas para constituir la dosis deseada. La dosificación terapéuticamente aceptable óptima y la frecuencia de dosis para un paciente dado (mamíferos, incluyendo seres humanos) depende de una diversidad de factores, tales como la actividad del material activo específico usado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo y vía de administración, tasa de aclaramiento. El objeto del tratamiento, es decir, la terapia o profilaxis y la naturaleza de la enfermedad trombotica a tratar, y la actividad antiplaquetaria o anticoagulante.

En las composiciones y combinaciones útiles como anticoagulantes en el paciente tratado (*in vivo*) una dosis diaria farmacéutica eficaz de los péptidos de la presente es entre aproximadamente 0,01 y 100 mg/kg de peso corporal, preferentemente entre 0,1 y 10 mg/kg de peso corporal.

Procedimientos experimentales (todos los datos relacionados con AT III o sus isoformas son datos de referencia).

La actividad biológica (IU/ml) de AT-III se determinó como la actividad del cofactor de heparina controlando la escisión del sustrato cromogénico H-D-Phe-Pip-Arg-pNA 2 HCl (Chromogenix, Suecia) con trombina en presencia de heparina y AT-III. Véase Frantzen Handeland y col. (Scand. J. Haematol. 31, 427-436, 1983) y van Voorhuizen y col. (Thromb. Haemostas. 52(3), 350-353, 1984).

La concentración de proteína total se determinó mediante mediciones de absorción a 280 nm (A_{280}). La concentración (mg/ml) para las soluciones de AT-III se calculó usando el coeficiente de 6,4 IU/mg. La actividad específica (SA) de AT-III se definió como la proporción entre la actividad del cofactor heparina, calculado como IU/ml, y A_{280} .

La HRGP se cuantificó usando una técnica de electroforesis en cohete, en la que la altura del “cohete” es proporcional a la concentración de antígeno (Laurell, C-B, (1996) Analyt. Biochem. vol. 15, pág. 45; y Laurell, C-B (1972) J. Clin. Lab. Invest. vol. 29, supl 124, pág. 21). Se incluyeron anticuerpos de conejo HRGP (Behringwerke) en un gel de Agarosa A al 1 % (Amersham Pharmacia Biotech). La muestra de HRGP (5 μ l) se aplicó al gel, que se ensayó durante una noche (150 V, 1 V/cm). El complejo anticuerpo-antígeno resultante se tiñó y se comparó con el patrón (suero humano).

El enfoque isoelectrico se realizó usando el PhastSystem (Amersham Pharmacia Biotech) con geles premoldeados, pl 3-9, de acuerdo con la técnica de separación del manual Phast, archivo N° 100.

El gel de intercambio de cationes fuertemente ácido Fractogel® EMD SO3-650 (M) se adquirió en Merck, Darmstadt, Alemania (Nº de catálogo 1.16882). Los grupos sulfónicos funcionales del gel, SO_3^- , están acoplados a la matriz de gel a través de brazos espaciadores de tipo "tentáculo", hidrófobos. La estructura monomérica del ligando (el grupo funcional y el brazo espaciador en combinación) es más específicamente sulfoisobutilacrilamida.

- 5 Las muestras de proteína se caracterizaron para AT-III α , III β y HRGP usando una columna Fractogel® de 10 ml EMD SO3-650 (M). El gel se equilibró con citrato sódico 10 mM, pH 7,5. La muestra de proteína (50 μ l) se aplicó al gel y la columna se lavó con 3 volúmenes de tampón de equilibrado (1 ml/min.). Las proteínas que se adsorbieron a la columna se eluyeron con cloruro sódico 1 M/citrato sódico 10 mM, pH 7,5. Los picos de proteína se detectaron a 280 nm.

10 **Ejemplos**

EJEMPLO 1: Separación de AT-III α , AT-III β y HRGP de acuerdo con la invención

Etapa 1

- 15 Se congeló plasma sanguíneo (1200 kg) a 0 °C y el crioprecipitado resultante (que comprendía, por ejemplo, el factor VIII y fibronectina) se retiró por centrifugación. El criosobrenadante resultante se procesó mediante una columna de intercambio de aniones (70 litros, DEAE-Sepharose FF, Amersham Pharmacia Biotech) para unir las proteínas dependientes de vitamina K (factor IX, factor X, factor II, proteína C, proteína S, etc.). El tampón contenía cloruro sódico 0,14 M y fosfato sódico 5 mM, pH 7,0. La fracción de proteína que no se unió a la columna se procesó adicionalmente mediante la adición de etanol a una concentración final del 8 % (v/v). El precipitado de la Fracción 1 de Cohn obtenido (que comprendía, por ejemplo, fibrinógeno y lipoproteínas, véase Cohn y col. (1946) J. Am. Chem. Soc. 68, 459-475) se retiró por centrifugación.

- 20 El sobrenadante de la Fracción 1 de Cohn (1400 kg) se procesó a través de una columna de cromatografía de afinidad (120 litros de heparina-Sepharose FF, Amersham Pharmacia Biotech) con lo que la antitrombina y la HRGP (glicoproteína rica en histidina) se unieron, mientras que la parte principal de las otras proteínas del plasma pasó a través de la columna. La columna se lavó con 600 kg de tampón (cloruro sódico 0,4 M y fosfato sódico 0,01 M, pH 7,8) y la fracción antitrombina/HRGP se eluyó con 500 kg de tampón (NaCl 2,3 M y fosfato sódico 0,01 M, pH 7,8). El eluido rico en antitrombina resultante se concentró y diafiltró frente a fosfato sódico 0,05 M, pH 7,5, usando una membrana de ultrafiltración (Biomax-10, Millipore). El concentrado diafiltrado obtenido se denominó UF1.

Etapa 2

- 30 Las etapas 2 a 4 se realizaron a temperatura ambiente (+22 °C). El concentrado UF1 ($A_{280} = 23,6$; Figura 1A, carril 1) se diluyó 1+3 con agua destilada. La solución diluida (2050 g, conductividad 2,6 mS/cm) se procesó a través de una columna (columna Pharmacia Biotech Bioprocess, de 15 cm de diámetro) cargada con un medio para cromatografía de intercambio de cationes Fractogel® EMD SO3-650 (M) (1,7 l) equilibrada con citrato sódico 10 mM, pH 7,5, 2,6 mS/cm. El caudal era de 9 l/h. Cuando la solución de proteína se hubo cargado en la columna, la columna se lavó con 7 volúmenes de tampón de equilibrado. El material que no se absorbió a la columna (denominado "Fracción A1"; Figura 1A, carril 2) se recogió (tiempo de retención 8 minutos; 2,3 kg) y se procesó adicionalmente en la Etapa 3, a continuación. El material, que se retardó mediante el intercambiador de cationes y se recogió a través del lavado (denominado "Fracción B1"; Figura 1A, carril 3), se recogió (tiempo de retención 104 min; 13,3 kg) y se procesó adicionalmente en la Etapa 4, a continuación.

- 40 Las proteínas adsorbidas más fuertemente se eluyeron desde la columna con 1,9 kg de tampón (NaCl 1 M/citrato sódico 10 mM, pH 7,5, conductividad 106 mS/cm). El eluato (1,9 kg) se concentró y diafiltró frente a citrato sódico 0,1 M, sacarosa al 1 %, pH 7,0. La "Fracción C" obtenida contenía HRGP básicamente pura (Tabla I).

Etapa 3

- 45 La fracción A1 obtenida en la Etapa 2 se ajustó con ácido cítrico 1 M a un pH de 6,75. La solución (con 2,3 l, conductividad 2,6 mS/cm) se procesó a través de la misma columna que en la etapa 2 (1,7 litros Fractogel® EMD SO3-650 (M)). El gel se equilibró con citrato sódico 10 mM, 2,6 mS/cm, pH 6,75. El caudal era 9 l/h. Después de que la solución de proteína (2,3 l) se haya bombeado a la columna, la columna se lavó con 3 volúmenes de tampón de equilibrado. Las proteínas que no se adsorbieron a la columna se recogieron (2-5 l), se concentraron y se diafiltraron frente a citrato sódico 0,1 M/sacarosa al 1 %, pH 7,0. La "Fracción A2" obtenida contenía AT-III α básicamente pura (Tabla I; Figura 1A, carril 5; Figura 1B, carril 5; y Figura 2A). Una segunda fracción (Figura 1A, carril 6), que eluyó de la columna con tampón de equilibrado, se descartó para minimizar la contaminación de la fracción de AT-III α .

- 50 Las proteínas que se habían adsorbido más fuertemente a la columna se lavaron a una potencia iónica "media" con 3 volúmenes de columna de NaCl 0,15 M/tampón citrato sódico 10 mM (conductividad de aproximadamente 13 mS/cm, pH 6,75), se recogieron (5 l, "Fracción B2"; Figura 1A, carril 7) y se procesaron adicionalmente en la Etapa 4.

55

Etapa 4

Las fracciones denominadas B1 y B2 se combinaron (Figura 1B, carril 1) y el pH se ajustó a 7,0. Se añadió agua destilada hasta que se alcanzó una conductividad de 2,6 mS/cm. La solución (40,6 l) se procesó después a través de la misma columna que en las Etapas 2 y 3 (1,7 l de Fractogel® EMD SO3-650 (M)), se equilibraron con citrato sódico 10 mM, 2,6 mS/cm, pH 7,0. El caudal era de 2 l/h. Para retirar las cantidades traza de AT-III α , la columna se lavó con un volumen de tampón de equilibrado (2,6 mS/cm) (véase la Figura 1B, carril 2) y posteriormente con un volumen de NaCl 80 mM/tampón citrato sódico 10 mM (7 mS/cm, pH 7,0). La fracción AT-III β se eluyó después con 3 volúmenes de columna de NaCl 1 M/citrato sódico 10 mM, pH 7,0, 106 mS/cm (tiempo de retención 52 min). El material eluido (2 litros) se concentró y diafiltró frente a citrato sódico 0,1 M/sacarosa al 1 %, pH 7,0. La "Fracción B3" obtenida (Figura 1B, carriles 4 y 6) contenía AT-III β básicamente pura (Tabla I).

TABLA I

Separación de las fracciones AT-III α , AT-III β y HRGP de acuerdo con la invención						
	A ₂₈₀	AT-III (IU/ml)	AT-III SA	AT-III (%)	AT-III α (%)	HRGP (mg/ml)
UF1	33	341	10	> 80	> 90	N.D.
Fracción A2 (AT-III α)	45	500	11	> 95	> 95	< 0.01
Fracción B3 (AT-III β)	4,5	44	10	< 95	< 5	< 0,01
Fracción C (HRGP)	16	2	0,1	< 1	< 1	4,2

En las Tablas I y II, la columna "AT-III (%)" es una estimación de la pureza de AT-III (AT-III α y AT-III β) como porcentaje del contenido de proteína total, mientras que "AT-III α (%)" es una estimación de la pureza de AT-III α como porcentaje del contenido de AT-III total. En ambos casos los valores se estiman a partir de observaciones del enfoque isoeléctrico y cromatografía de intercambio de cationes analítica.

En experimentos similares con otros tipos de intercambiador de cationes (CM-Sepharose®, SP-Sepharose®, Fractogel® CM-650 (M); donde CM denota carboximeto y SP denota sulfopropilo) no se consiguió una separación suficiente de AT-III α , AT-III β y HRGP. Se concluyó que la mayor capacidad de intercambio del medio proporcionada con un brazo espaciador de tipo "tentáculo" es necesaria para una separación eficaz de AT-III α , AT-III β y HRGP.

Referencia - EJEMPLO 2: Separación de AT-III α y AT-III β de una manera conocida usando cromatografía de heparina-Sepharose.

Se vertió gel de heparina-Sepharose FF (13 l) en una columna (d = 32 cm) y se equilibró con NaCl 0,15 M/Tris 20 mM, pH 7,5. El concentrado denominado UF1 (véase el Ejemplo 1, etapa 1) (7075 g; actividad del cofactor de heparina 78 IU/ml) se aplicó al gel. El caudal era 50 l/h. La columna se lavó con 3 volúmenes de tampón de equilibrado y la elución comenzó con un gradiente lineal (10 volúmenes de columna) con NaCl desde 0,15 hasta 1,5 M. La elución de proteína se siguió usando un espectrofotómetro de flujo de paso (280 nm). El primer pico de proteína, aproximadamente 60 litros, se recogió y concentró en un sistema de ultrafiltración (PLGC 10kd, Millipore). La "Fracción D" obtenida contenía principalmente AT-III α (Tabla II; y Figura 1B, carril 7). El segundo pico, de aproximadamente 100 litros, se recogió y concentró en un sistema de ultrafiltración (PLGC 10kd, Millipore). La "Fracción E" obtenida contenía AT-III β (Tabla II; y Figura 1B, carril 8).

TABLA II

Separación de las fracciones AT-III α , AT-III β y HRGP de acuerdo con procedimientos conocidos						
	A ₂₈₀	AT-III (IU/ml)	AT-III SA	AT-III (%)	AT-III α (%)	HRGP (mg/ml)
UF1	7,1	78	11	> 80	> 95	N.D.
Fracción D (AT-III α)	8,6	67	8	> 60	> 90	1,9
Fracción E (AT-III β)	5,3	48	9	> 80	10-30	0,9

Una comparación de las Tablas I y II indica que el procedimiento de acuerdo con la invención (Ejemplo 1) es mejor para la purificación de AT-III α y AT-III β . La fracción AT-III α (A2) del Ejemplo 1 contenía menos del 5 % de AT-III β y menos del 5 % de HRGP, mientras que la fracción AT-III α (D) del Ejemplo 2 contenía más de un tercio de HRGP, así como una mayor cantidad de AT-III β . La fracción AT-III β (B3) del Ejemplo 1 contenía menos del 5 % de AT-III α y menos del 5 % de HRGP, mientras que la fracción AT-III β (E) del Ejemplo 2 estaba contaminada con HRGP

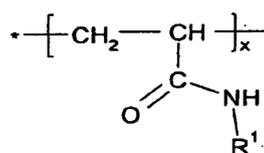
(aproximadamente 20 %) así como AT-III α (10-30 %).

5 Los resultados obtenidos con el enfoque isoeléctrico (Figura 1) confirman que el procedimiento de acuerdo con la invención es mejor que el procedimiento conocido. Los carriles 5 y 6 en la Figura 1B muestran las fracciones A2 y B3, respectivamente, obtenidas de acuerdo con la invención. Los carriles 7 y 8 en la Figura 1B muestran las fracciones D y E obtenidas de acuerdo con el procedimiento conocido del Ejemplo 2. Son visibles dos bandas distintas para cada AT-III α (carril 5) y AT-III β (carril 6). En contraste, los carriles 7 y 8 indican contaminación cruzada de las dos isoformas de AT-III. Se ha aplicado la misma cantidad de proteína en los carriles 5 a 8.

10 La diferencia de los procedimientos de acuerdo con el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2 es evidente también a partir de la Figura 2. La muestra de AT-III α purificada de acuerdo con la invención (Fracción A2, Figura 2A) está representada por un solo pico, mientras que el pico que representa la fracción D (Figura 2B) indica contaminación de otras proteínas. Se obtuvo un resultado similar con una comparación entre las fracciones B3 y E.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la purificación de una preparación que comprende glicoproteína rica en histidina (HRGP), que comprende las etapas de
- 5 (i) preparar una solución que comprende principalmente AT-III y glicoproteína rica en histidina (HRGP);
(ii) poner en contacto dicha solución con un gel de intercambio de cationes en el que el grupo intercambiador de cationes está fijado a la matriz del gel a través de una cadena polimérica lineal, en condiciones en las que la AT-III puede eluirse del gel a una potencia iónica baja, mientras que la HRGP está unida al gel a una potencia iónica baja;
10 (iii) eluir en condiciones de potencia iónica media o alta y recoger la fracción de proteína fijada al gel de intercambio de cationes.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de intercambio de cationes se realiza mediante cromatografía en columna.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de intercambio de cationes se realiza a un pH de 6,5 a 8.
- 15 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha solución que comprende principalmente AT-III y HRGP se prepara mediante un procedimiento que comprende las etapas de
- (i) preparar un sobrenadante de la fracción I de Cohn a partir de plasma humano;
(ii) poner en contacto dicho sobrenadante de la fracción I de Cohn con un gel de afinidad capaz de unir AT-III y HRGP; y
20 (iii) eluir y recoger la fracción de proteína unida a dicha matriz de afinidad.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho gel de afinidad comprende heparina como el ligando de afinidad.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la HRGP se eluye del gel de intercambio de cationes con un tampón que tiene la conductividad de 10 a 450 mS/cm a temperatura ambiente.
- 25 7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho intercambiador de cationes es un intercambiador de cationes fuertemente ácido.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho intercambiador de cationes fuertemente ácido tiene un grupo sulfónico como su grupo funcional.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha cadena polimérica lineal consiste en
30 unidades repetidas de la fórmula

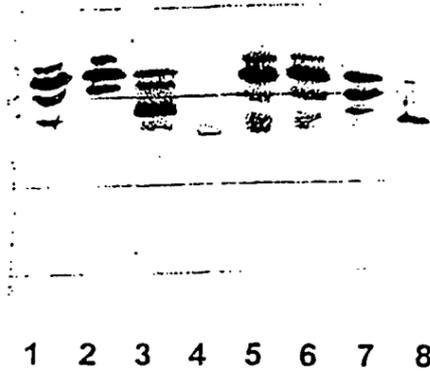


en la que x es de 2 a 100; y

R¹ es alquilo C₁₋₁₀ ramificado o no ramificado, sustituido con sulfonilo.

10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho alquilo C₁₋₁₀ es isobutilo.
- 35

A



B

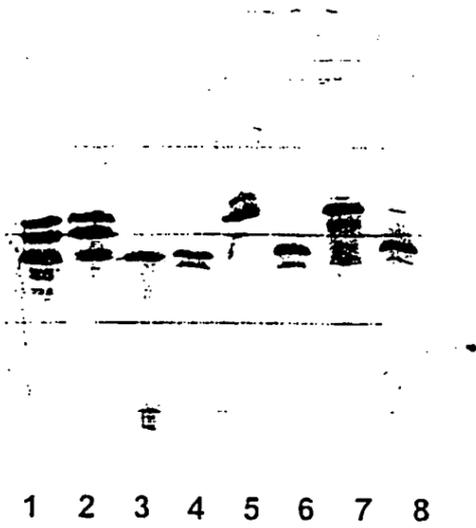


FIG. 1

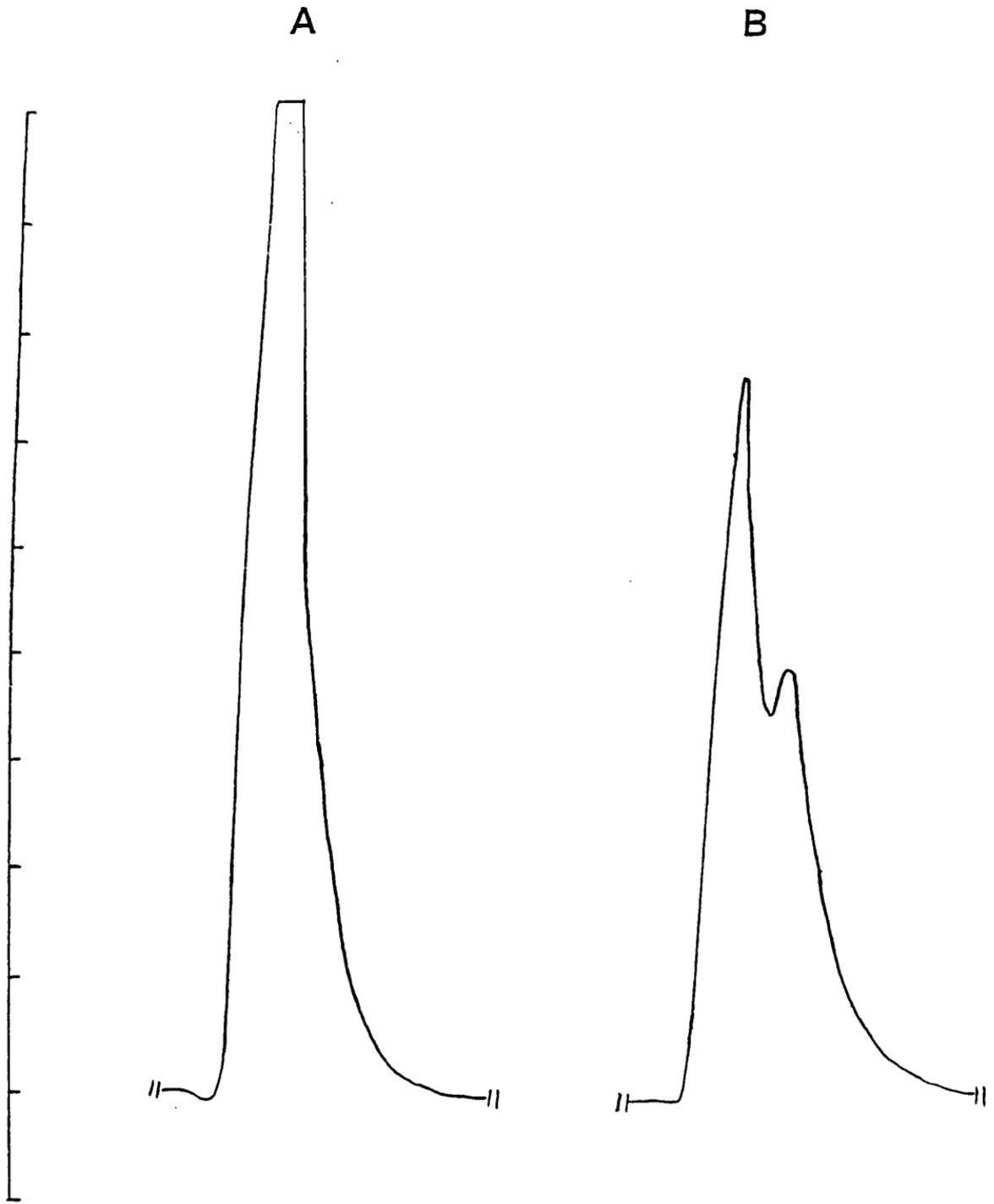


FIG. 2