

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 035**

51 Int. Cl.:
C07K 14/765 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01978882 .7**
96 Fecha de presentación: **24.10.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1329461**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2003**

54 Título: **MÉTODO PARA ELIMINAR POLÍMEROS DE SEROALBÚMINA HUMANA.**

30 Prioridad:
24.10.2000 JP 2000324029

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.01.2012

73 Titular/es:
**JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-
THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE
6-1, OKUBO 1-CHOME
KUMAMOTO-SHI, KUMAMOTO 860-8568, JP**

72 Inventor/es:
**ADACHI, Satoshi;
MIZOKAMI, Hirosh;
TAJIMA, Yoshitaka;
MIYATSU, Yoshinobu;
NOUCHI, Toshinobu y
USHIO, Yoshitaka**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 373 035 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

Método para eliminar polímeros de seroalbúmina humana.

CAMPO TÉCNICO

- 5 La presente invención se refiere a un método para eliminar un multímero de seroalbúmina humana. Más específicamente, la presente invención está relacionada con un método para eliminar un multímero de seroalbúmina humana que comprende la etapa de poner en contacto una disolución de seroalbúmina humana que contiene multímeros de seroalbúmina humana con un intercambiador aniónico en condiciones específicas.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

- 10 La seroalbúmina humana (designada de aquí en adelante también como "HSA") es un componente proteico importante presente en el plasma, consiste en un polipéptido monocatenario que comprende 585 restos aminoacídicos y tiene un peso molecular igual a aproximadamente 66.000 Da (véase Minghetti, P. P. *et al.* (1986), "Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within 11-22 of chromosome 4". J. Biol. Chem. 261, pág. 6747-6757). Es conocido que los papeles principales de la HSA no son solo mantener la presión osmótica normal de la sangre, sino también unirse a una variedad de sustancias tales como iones de calcio, 15 ácidos grasos, bilirrubina, triptófano y fármacos posiblemente presentes en la sangre, desempeñando así el papel de portador para transportar estas sustancias. La HSA purificada se ha usado, por ejemplo, en el tratamiento postoperatorio después de operaciones quirúrgicas y en el tratamiento de hipoalbuminemia causada por la pérdida de albúmina tal como en choque hemorrágico, quemaduras y síndromes nefróticos.

- 20 Convencionalmente, la HSA se ha preparado sometiendo plasma humano al método de fraccionamiento con etanol a baja temperatura de Cone o a cualquier método similar al mismo, dando fracciones que contienen HSA (la HSA se fracciona en la fracción V) y purificando entonces la fracción mediante el uso de una variedad de técnicas de purificación. Además, se ha desarrollado recientemente un método en que no se usa plasma humano como material bruto, por ejemplo, una técnica para producir seroalbúmina humana usando células de levadura, *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, haciendo uso de la técnica de recombinación génica.

- 25 Estas técnicas de recombinación génica se detallan en (1) "Production of recombinant Human Serum Albumin from *Saccharomyces cerevisiae*"; Quirk, R. *et al.* Biotechnology and Applied Biochemistry, 1989, 11: 273-287, (2) "Secretory Expression of the Human Serum Albumin Gene in the Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*"; Ken Okabayashi *et al.* J. Biochemistry, 1991, 110: 103-110, (3) "Yeast Systems for the Commercial Production of Heterologous Proteins"; Richard G. Buckholz y Martin A. G. Gleeson, Bio/Technology, 1991, 9: 1067-1072 para la levadura, (4) "Construction of DNA sequences and their use for microbial production of proteins, in particular, human serum albumin"; Lawn, R. M. publicación de patente europea nº 0073646A (1983), (5) "Synthesis and Purification of mature human serum albumin from *E. coli*"; Latta, L. *et al.* Biotechnique, 1987, 5: 1309-1314 para *Escherichia coli* (*E. coli*), (6) "Secretion of human serum albumin from *Bacillus subtilis*"; Saunders, C. W. *et al.* J. Bacteriol. 1987, 169: 2917-2925 para *Bacillus subtilis*.

- 35 Los métodos para purificar la seroalbúmina humana utilizables en la presente memoria incluyen en general aquellos usados actualmente en la química de proteínas tales como el método de precipitación salina, el método de ultrafiltración, el método de precipitación isoelectrica, el método de electroforesis, la técnica de cromatografía de intercambio iónico, la técnica de cromatografía de filtración en gel y/o la técnica de cromatografía de afinidad. Es más, la fracción que contiene seroalbúmina humana incluye diversas clases de contaminantes originados, por ejemplo, en tejidos biológicos, células y sangre y, por lo tanto, la seroalbúmina humana se ha purificado mediante una complicada combinación de los métodos anteriores.

- 45 En la producción industrial de seroalbúmina humana, es inevitable tratar la misma en diversas condiciones diferentes de las condiciones ambientales observadas en el cuerpo humano y, en consecuencia, se forman multímeros de seroalbúmina humana. No es conocido todavía ningún informe de que estos multímeros afecten adversamente al cuerpo humano en la aplicación clínica de seroalbúmina humana, pero existe la sospecha de que estos multímeros pueden desarrollar una antigenicidad novedosa. Por esta razón, se prescribe un límite superior de contaminación con estos multímeros en el ensayo de estandarización de "seroalbúmina humana" como agente farmacéutico desde el punto de vista de la seguridad de la misma como medicamento y, por lo tanto, se vuelve un problema importante reducir sustancialmente el contenido de dichos multímeros en la preparación en la producción de una preparación 50 farmacéutica que contenga la misma.

- Dos o más moléculas de seroalbúmina humana se ligan entre sí formando dicho multímero de la misma; el punto isoelectrico y las características químicas del último son correspondientemente bastante similares a los observados para el monómero y, por lo tanto, es muy difícil separar los multímeros de los monómeros según los métodos de purificación empleados en el proceso de producción habitual. Por esta razón, en las técnicas convencionales, se han eliminado los multímeros mediante una combinación de varios tipos de métodos de purificación seleccionados del grupo consistente en técnicas de cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, fraccionamiento isoelectrico, fraccionamiento con sulfato de amonio y fraccionamiento con 55

etanol (véanse TOKUHYO Hei 11-509525 (publicación internacional de patente WO96/37515) y la patente japonesa nº 2.926.722 (registrada el 14 de mayo de Heisei 11 (1999)).

5 Si se usa una pluralidad de métodos de purificación en combinación, la tasa final de recuperación es el producto de las conseguidas en las etapas de purificación usadas y, por lo tanto, la productividad resultante se reduce significativamente en la mayoría de casos. En consecuencia, se ha deseado el desarrollo de un método que pueda reducir el número de etapas de purificación lo más posible, que permita la eliminación eficaz de multímeros de la seroalbúmina humana y que permita la recuperación de monómeros de la misma con alto rendimiento desde el punto de vista industrial.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

10 En consecuencia, es un objeto de la presente invención proporcionar un método de una etapa para eliminar eficazmente los multímeros de seroalbúmina humana formados durante el proceso para la preparación de seroalbúmina humana.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar seroalbúmina humana que tenga una alta seguridad como medicamento.

15 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para purificar un monómero de seroalbúmina humana recombinante de una disolución que incluye un multímero de seroalbúmina humana recombinante que comprende (a) tratar la disolución a pH 9,0 durante más de 5 horas para convertir el multímero de seroalbúmina humana recombinante en monómeros y (b) cargar la disolución así tratada en un intercambiador aniónico equilibrado con un tampón que contiene una sal a una concentración en el intervalo de 10 a 100 mM y que tiene un valor de pH
20 en el intervalo de 5,5 a 7,5, y recuperar una fracción pasada por el intercambiador aniónico sin adsorberse sobre el mismo. Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona seroalbúmina humana de alta pureza, que se prepara mediante un proceso de producción que incluye la etapa del método anterior y cuyo contenido de multímero es reducido. La presente invención se describirá a continuación con más detalle.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La Fig. 1 es un diagrama que muestra los resultados obtenidos sometiendo a HPLC por filtración en gel a una muestra obtenida después de dializar una disolución de HSA que contiene multímeros de la misma frente a un tampón fosfato 50 mM (pH 6,5) que contiene NaCl 75 mM (muestra antes del tratamiento) y a una fracción obtenida tratando la muestra dializada con una columna de cromatografía de intercambio aniónico fuerte equilibrada con la misma disolución tampón y recogiendo una fracción que pase por la misma (muestra después del tratamiento).

MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

30 El método de la presente invención se caracteriza por tratar una disolución de seroalbúmina humana que contiene un multímero de la misma con una disolución tampón que tiene una concentración salina apropiada, poner en contacto posteriormente la disolución de seroalbúmina humana con un intercambiador aniónico equilibrado con la misma disolución tampón para adsorber por tanto el multímero sobre el intercambiador aniónico, eliminando así el
35 multímero de la disolución de seroalbúmina humana, y recuperar entonces la seroalbúmina humana resultante con alta pureza. Por tanto, el método de la presente invención permitiría una preparación eficaz de seroalbúmina humana de alta pureza sustancialmente exenta de cualquier multímero de seroalbúmina humana.

40 La seroalbúmina humana para someter al tratamiento anterior con intercambiador aniónico puede ser seroalbúmina humana recombinante obtenida mediante la técnica de recombinación génica (designada también a continuación como "rHSA") o HSA.

45 Cuando se prepara HSA a partir de plasma, se esperaría que el multímero pudiera formarse en cada etapa, pero pueden usarse en la invención disoluciones acuosas que contienen multímero obtenidas en cualquiera de dichas etapas. Los ejemplos de dichas disoluciones acuosas son una disolución acuosa de la fracción V obtenida mediante fraccionamiento con alcohol a baja temperatura y disoluciones acuosas que contienen multímero generadas en las diversas etapas de purificación posteriores (tales como cromatografía y tratamiento térmico) de la fracción V.

50 Pueden usarse igualmente en la presente invención disoluciones acuosas que contienen multímero generadas en las diversas etapas para la preparación de rHSA. Son ejemplos específicos de las mismas caldo de cultivo de células hospedadoras productoras de rHSA y disoluciones acuosas que contienen multímero generadas en las diversas etapas de purificación posteriores (tales como cromatografía y tratamiento térmico) del caldo de cultivo. A este respecto, el término "caldo de cultivo" usado en la presente memoria incluye el caldo de cultivo en que se cultivan las células hospedadoras anteriores y líquidos que contienen células hospedadoras trituradas, en los que las células hospedadoras se Trituran mediante cualquier método usado actualmente.

El hospedador productor de rHSA no está limitado a ninguno específico, y aquellos utilizables en la presente memoria incluyen, por ejemplo, levadura, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y células animales. Se usan

preferiblemente en la presente memoria células de levadura tales como las pertenecientes a los géneros *Saccharomyces* y *Pichia*, siendo más preferida la cepa AH22 de *Saccharomyces cerevisiae* o mutantes de la misma.

5 En el método de la presente invención, es deseable usar una seroalbúmina humana que contenga contaminantes originados en el plasma o las células hospedadoras recombinantes, que se purifica en cierta medida (pureza de la HSA o rHSA no inferior a aproximadamente un 85%) mediante etapas de procesamiento tales como técnicas de ultrafiltración, tratamiento térmico, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de adsorción, cromatografía de filtración en gel y/o precipitación salina.

10 Las clases de disoluciones tampón usadas para preparar la disolución de albúmina anterior no están limitadas a unas específicas, sino que las usadas preferiblemente en la presente memoria incluyen, por ejemplo, disoluciones tampón de fosfato y disoluciones tampón de Tris-HCl usadas en la cromatografía de intercambio aniónico habitual. La concentración de componentes tampón presentes en la disolución tampón está fijada en general a un nivel usado actualmente en la cromatografía de intercambio aniónico habitual. Más específicamente, la concentración de los mismos está preferiblemente en el intervalo de 5 a 200 mM, y más preferiblemente de 10 a 100 mM.

15 Es suficiente en la presente invención con ajustar el valor de pH de la disolución tampón al intervalo en que el multímero de seroalbúmina humana pueda adsorberse sobre el intercambiador aniónico en la disolución tampón exenta de cualquier sal. Más específicamente, el valor de pH de la disolución tampón usada en la presente memoria se encuentra en el intervalo de 5 a 9,5, preferiblemente de 5,5 a 7,5, y más preferiblemente de 6 a 7.

20 Los ejemplos de sales añadidas a la disolución tampón incluyen cloruros de metales alcalinos tales como cloruro de sodio y cloruro de potasio, usándose preferiblemente cloruro de sodio en la presente memoria. La concentración de sal se selecciona preferiblemente de tal manera que el multímero pueda adsorberse sobre el intercambiador aniónico, pero ningún monómero se adsorba nunca sobre el mismo. Se ajusta apropiadamente dependiendo de la clase, concentración y valor de pH de la disolución tampón usada y puede estar en el intervalo de 10 a 150 mM, preferiblemente de 25 a 100 mM, y más preferiblemente de 50 a 75 mM.

25 Puede prepararse una disolución de seroalbúmina humana que contiene multímero de seroalbúmina humana disuelta en una disolución tampón que tiene una concentración salina en el intervalo de 10 a 150 mM y un valor de pH en el intervalo de 5 a 9,5 usando, por ejemplo, un método que comprende la etapa de sustituir el medio de la disolución de seroalbúmina humana por la disolución tampón mediante diálisis de una seroalbúmina humana disuelta en una disolución arbitraria frente a una disolución tampón que tiene una concentración salina en el intervalo de 10 a 150 mM y un valor de pH en el intervalo de 5 a 9,5; un método de filtración en gel o un método que comprende las etapas de concentrar una vez una disolución de seroalbúmina humana, diluir la disolución de albúmina concentrada con el tampón anterior y repetir entonces estas dos etapas las veces deseadas hasta sustituir por tanto el medio de la disolución de albúmina inicial por el tampón.

30 La concentración de seroalbúmina humana en la disolución de la misma no está limitada a ninguna específica en la medida en que la seroalbúmina humana esté completamente disuelta en la disolución, y se encuentra preferiblemente en el intervalo de 1 a 30%, y más preferiblemente de 5 a 25%.

35 En cuanto al portador básico del intercambiador aniónico, se prefiere seleccionar uno que no adsorba nunca seroalbúmina humana no específicamente. Además los grupos de intercambio aniónico utilizables en la presente memoria pueden ser grupos de intercambio aniónico fuertes o de intercambio aniónico débiles, pero se usan preferiblemente en la invención los primeros. Dicho intercambiador aniónico fuerte que porta grupos de intercambio aniónico fuerte no está limitado a ninguno particular y los ejemplos específicos de los mismos incluyen Q-Sepharose FF (disponible en Amersham-Pharmacia-Biotech Company) y Cellufine Q (disponible en Millipore Company).

40 Los ejemplos de métodos para eliminar multímeros de seroalbúmina humana usando un intercambiador aniónico incluyen el método que comprende las etapas de tratar una disolución de albúmina que contiene un multímero de albúmina mediante cromatografía en columna para adsorber por tanto selectivamente el multímero de albúmina sobre el intercambiador aniónico y recuperar entonces una fracción exenta de cualquier multímero que puede pasar por la columna sin adsorberse sobre la misma; y un método que comprende las etapas de poner en contacto la disolución de albúmina que contiene multímero por lotes con un intercambiador aniónico para adsorber por tanto selectivamente el multímero sobre el intercambiador aniónico, permitiendo a la disolución que contiene el intercambiador aniónico reposar o centrifugando la disolución para separar por tanto el intercambiador aniónico de la disolución y recuperar entonces el sobrenadante resultante. En la presente invención, puede usarse cualquiera de estos métodos. En el caso de cromatografía en columna, por ejemplo, las condiciones para la cromatografía, tales como tamaño de columna y caudal, pueden ajustarse apropiadamente dependiendo de la concentración y volumen de la muestra específica. Por ejemplo, se usan las siguientes condiciones de cromatografía en columna para el tratamiento de 10 l de una disolución de seroalbúmina humana al 10%: un volumen de intercambiador aniónico de 25 l, un tamaño de columna de 700 cm²×35 cm y un caudal de 1200 ml/min.

45 El grado de eliminación del multímero de seroalbúmina humana puede monitorizarse mediante el análisis de una parte del líquido recuperado durante el tratamiento usando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con filtración en gel. Por ejemplo, este análisis puede llevarse a cabo cargando la disolución de muestra en

una columna TSKgel G3000SW (disponible en Tosoh Corporation), eluyendo con tampón KH_2PO_4 0,1 M/NaCl 0,3 M y determinando entonces la absorbancia de las fracciones resultantes a 280 nm.

Ejemplos

Ejemplo de preparación: Preparación de una disolución de seroalbúmina humana que contiene multímero

- 5 Según el método dado a conocer en TOKUHYO Hei 11-509525, se produjo rHSA usando células de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Se diluyó este caldo de cultivo que contenía rHSA con agua purificada hasta un volumen total de aproximadamente dos veces el original y se ajustó entonces el valor de pH de la disolución diluida a 4,5 usando una disolución acuosa de ácido acético. Se cargó entonces la disolución en una columna STREAMLINE SP (disponible en Amersham Pharmacia Biotech Company; diámetro 60 cm × 16 cm), que se había equilibrado con disolución tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 4,5) que contenía cloruro de sodio 50 mM. Después de ello, se lavó la columna con una disolución tampón idéntica a la usada para equilibrar la columna, seguido del paso a través de la columna de una disolución tampón fosfato 50 mM (pH 9,0) que contenía cloruro de sodio 300 mM, dando fracciones que contienen rHSA. Se ajustó a 9,0 el valor de pH de la fracción que contiene HSA eluida de la columna STREAMLINE SP con borato, y se permitió reposar entonces la fracción durante más de 5 horas para convertir así parcialmente el multímero de seroalbúmina humana en los monómeros de la misma.

Ejemplo 1: Cromatografía de intercambio aniónico fuerte después de diálisis

- 20 Se dializó una disolución de seroalbúmina humana que contenía un 6,1% (determinado mediante análisis de HPLC con filtración en gel) de multímeros de seroalbúmina humana, preparada según el mismo método usado en el ejemplo de preparación, frente a un tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 6,5) que contenía cloruro de sodio 50, 75 o 100 mM a temperatura ambiente durante 8 horas, se cargó la disolución dializada de seroalbúmina humana en una columna Q-Sepharose FF (diámetro 2,5 cm × 10 cm), que se había equilibrado con la misma disolución tampón por adelantado, se alimentó la misma disolución tampón a la columna (500 ml, velocidad de elución: 12 ml/min) y se recuperaron todas las fracciones pasadas a través de la columna sin experimentar adsorción sobre la columna.

Ejemplo de ensayo 1: Análisis de HPLC con filtración en gel

- 25 Se cargó la fracción (0,02 ml) pasada a través de la columna sin experimentar adsorción y obtenida en el ejemplo 1 sobre TSKgel G3000SW (disponible en Tosoh Corporation) (diámetro 0,75 cm × 30 cm), que se había equilibrado con un tampón KH_2PO_4 0,1 M que contenía NaCl 0,3 M, y se realizó el análisis de HPLC con filtración en gel a una longitud de onda de detección de 280 nm. Los resultados obtenidos por tanto en este ejemplo de ensayo 1 se resumen en la siguiente tabla 1 y se representan en la Figura 1.

- 30 Tabla 1

Muestra	Tasa de recuperación de rHSA (%)	Contenido de monómero (%)	Contenido de multímero (%)
Muestra antes del tratamiento		93,9	6,1
Muestra tratada con tampón que contiene NaCl 50 mM	98,3	100,0	0,0
Muestra tratada con tampón que contiene NaCl 75 mM	97,2	100,0	0,0
Muestra tratada con tampón que contiene NaCl 100 mM	98,5	98,1	1,9

- 35 Los datos enumerados en la Tabla 1 indican que puede obtenerse con alto rendimiento seroalbúmina humana cuya concentración de multímero es reducida cuando se dializa una disolución de seroalbúmina humana que contiene multímero frente a una disolución tampón de fosfato que contiene cloruro de sodio a una concentración en el intervalo de 50 a 75 mM, y se pasa entonces la disolución dializada a través de una columna de intercambio aniónico fuerte equilibrada con la misma disolución tampón usada anteriormente para adsorber por tanto selectivamente el multímero sobre el intercambiador aniónico fuerte.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

- 40 La presente invención permite la eliminación eficaz de multímeros de seroalbúmina humana y la recuperación de monómeros de seroalbúmina humana con alto rendimiento mediante la sustitución del medio de una disolución de seroalbúmina humana que contiene multímeros de la misma por una disolución tampón que tiene una composición deseada y poniendo entonces en contacto la disolución tamponada con un intercambiador aniónico equilibrado con la misma disolución tampón.

Además, el método de la presente invención permite también la preparación de seroalbúmina humana de alta pureza sustancialmente exenta de cualquier multímero de seroalbúmina humana, que puede convertirse en causa de efectos secundarios tales como choque o alergia observados cuando se administra a un ser humano.

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar un monómero de seroalbúmina humana recombinante de una disolución que incluye un multímero de seroalbúmina humana recombinante, que comprende:
 - 5 (a) tratar la disolución a pH 9,0 durante más 5 horas para convertir el multímero de seroalbúmina humana recombinante en monómeros; y
 - (b) cargar la disolución tratada por tanto en un intercambiador aniónico equilibrado con un tampón que contiene una sal a una concentración en el intervalo de 10 a 100 mM y que tiene un valor de pH en el intervalo de 5,5 a 7,5, y recuperar una fracción pasada a través del intercambiador aniónico sin adsorberse sobre el mismo.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que el tampón contiene la sal a una concentración en el intervalo de 25 a 100 mM y tiene un valor de pH en el intervalo de 5,5 a 7,5.
3. El método de la reivindicación 2, en el que el tampón contiene la sal a una concentración en el intervalo de 50 a 75 mM y tiene un valor de pH en el intervalo de 6 a 7.
- 15 4. El método según se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el intercambiador aniónico es un intercambiador aniónico fuerte.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la seroalbúmina humana recombinante se produce por células de levadura.

