



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 379 157**

⑤1 Int. Cl.:  
**C07K 14/47** (2006.01)

①2

# TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **05794729 .3**

⑨6 Fecha de presentación : **19.10.2005**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1802654**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

⑤4 Título: **Procedimiento para el aislamiento de haptoglobina.**

③0 Prioridad: **19.10.2004 GB 0423196**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.04.2012**

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.04.2012**

⑦3 Titular/es: **BIO PRODUCTS LABORATORY LIMITED**  
**Dagger Lane Elstree**  
**Hertfordshire WD6 3BX, GB**

⑦2 Inventor/es: **Dalton, Joan;**  
**Podmore, Adrian y**  
**Kumpalume, Peter**

⑦4 Agente/Representante:  
**Arias Sanz, Juan**

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 el aislamiento de haptoglobina.

5 La haptoglobina (Hp) es una proteína de respuesta de fase aguda que se sintetiza principalmente en el hígado. También se sintetiza en otros tejidos, tales como las paredes arteriales, el endometrio y el peritoneo.

La función principal de la Hp es como proteína de unión de la hemoglobina (Hb), necesaria para el procesamiento terminal y eliminación de la Hb libre, principalmente en el sistema retículo endotelial (SER) del hígado. Este sistema  
10 permite conservar el hierro presente en el resto Hb.

La molécula hemo (ferroprotoporfirina IX) encontrada en la Hb es un elemento indispensable en una amplia variedad de otros sistemas proteicos (p. ej., enzimas, tales como ciclooxigenasa [COX] y óxido nítrico sintasa [NOS]), que actúan de acuerdo con las propiedades del(los) polipéptidos unidos a ella. No obstante, un exceso de hemo libre  
15 puede producir daños celulares y lesiones tisulares (p. ej., en riñones, pulmones y SNC), ya que cataliza la formación de especies de oxígeno reactivo, que, a su vez, producen estrés oxidativo.

La hemólisis intravascular se produce fisiológicamente, pero también acelera como complicación grave en varias enfermedades autoinmunitarias, infecciosas (p. ej., paludismo) y hereditarias (p. ej., drepanocitosis). Durante la hemólisis, la Hb vascular libre es captada por la Hp y transportada al SER hepático. Asimismo, puede tener lugar algún procesamiento en los monocitos-macrófagos. No obstante, la Hb vascular libre se puede convertir rápidamente en met-Hb, que libera fácilmente el resto hemo potencialmente tóxico. El hemo vascular libre es capturado por la albúmina o la hemopexina (Hx) y es transportado al hígado para la degradación en el SRE. Cuando se acumulan grandes cantidades de hemo (p. ej., en un coágulo de sangre o depósito vascular), los mecanismos secuestrantes se  
25 ven superados o incapaces de acceder al hemo libre y se producen daños tisulares. Si la cantidad de lisis de glóbulos rojos satura el sistema de eliminación de hemo/Hb, la Hb comenzará a aparecer en la orina (filtración glomerular en el riñón).

La Hp tiene una estructura tetramérica que comprende dos cadenas  $\alpha$  y dos  $\beta$  unidas por puentes disulfuix). La  
30 cadena  $\beta$  (245 aminoácidos) tiene una masa de aproximadamente 40 kDa (del cual 30% p/p en hidrato de carbono) y comparte todos los fenotipos. La cadena  $\alpha$  existe en dos formas:  $\alpha\alpha 1$ , (83 aminoácidos, 9 kDa) y  $\alpha 2$  (142 aminoácidos, 17,3 kDa) y, por tanto, la Hp se produce en tres fenotipos, denominados Hp1-1, Hp2-1 y Hp2-2. La Hp1-1 contiene dos cadenas  $\alpha 1$ , la Hp2-2 contiene dos cadenas  $\alpha 2$  y la Hp2-1 contiene una cadena  $\alpha 1$  y una  $\alpha 2$ . La HP1-1 tiene una masa molecular de 100 kDa o 165 kDa cuando forma complejo con la Hb. La Hp1-1 existe en forma de una única isoforma  
35 y también se denomina dímero Hp. La H2-1 tiene una masa molecular media de 220 kDa y forma polímeros lineales. La Hp2-2 tiene una masa molecular media de 400 kDa y forma polímeros cíclicos. Cada forma polimérica diferente es una isoforma diferente. Se ha concebido una metodología de PCR (Koch y col. 2002, Clin. Chem 48:1377-1382) para estudiar el polimorfismo de Hp.

La Hp se ha identificado como posible tratamiento para trastornos renales causados por hemólisis. Es potencialmente útil terapéuticamente como medio de eliminar la hemoglobina libre; los complejos formados de este modo tienen posibles beneficios adicionales como agentes antiinflamatorios, antioxidantes o angiogénicos. No obstante, la Hp se considera difícil de aislar en grandes cantidades y conservar su actividad biológica. Se han descrito diversos protocolos para aislar la Hp. Uno habitual es la cromatografía de afinidad. Los ligandos de afinidad usados incluyen anticuerpos monoclonales (Katnik y Jadach, 1993, Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warz) Vol. 41: 303-308 y Tseng y col.,  
45 2004, Protein Expr Purif 33: 265-273), hemoglobina (Liau y col., 2003, J Chromatogr. Analyt, Technol Biomed Life Sci. 790: 209-216 y Chiancone y col. 1995, J Chromatogr. Biomed Appl. 664: 89-95) y concanavalina A (Katnik y col. 1995, Eur J Clin. Chem. Clin. Biochem 33:727-732).

Aunque los protocolos de ligando de afinidad basados en anticuerpos monoclonales tienen como resultado un producto razonablemente puro, solo se han comunicado rendimientos bajos. Dichos procedimientos de aislamiento tampoco son muy adecuados para los procedimientos de producción a gran escala como resultado de la necesidad de grandes cantidades de ligando de afinidad. En particular, es probable que las cantidades necesarias de anticuerpos monoclonales sean prohibitivamente caros y difíciles de obtener. Los anticuerpos monoclonales también tienen el  
55 posible inconveniente de ser selectivo para varias isoterms de Hp. El uso de Hb como el ligando de afinidad ha conseguido más éxito. Se han conseguido buenos rendimientos de Hp razonablemente homogénea, aunque, como ocurre con todos los protocolos basados en ligandos de afinidad, escalar el procedimiento es difícil y a menudo no es rentable. Otro inconveniente de los protocolos basados en ligandos de afinidad es que si el producto de Hp está destinado a su uso como agente farmacéutico, la fuente del ligando de afinidad debe controlarse. A este respecto, la Hb  
60 puede no ser aceptable para los reguladores, ya que su fuente son los glóbulos rojos. También es necesario monitorizar y controlar la pérdida de ligando, ya que la presencia del ligando de afinidad en el producto puede plantear problemas para su uso seguro en pacientes.

También se ha descrito la precipitación selectiva de Hp por un extracto de raíz vegetal (Nayak, y col., 2002, Pro. Pep. Lett 9: 503-510). No obstante, como la cromatografía de afinidad, este protocolo tampoco es adecuado para la producción comercial a gran escala.

Asimismo se han realizado técnicas basadas en HPLC (cromatografía de líquidos de alto rendimiento) sobre un precipitado de sulfato amónico de suero porcino (Yang y Mao, 1999, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 731: 395-402). De nuevo, este protocolo sólo se considera adecuado para el aislamiento a pequeña escala de la Hp.

Un enfoque alternativo al aislamiento de la Hp ha sido la cromatografía de intercambio iónico. Los documentos US 4,061,735 y US 4,137,307 han descrito el aislamiento de la Hp a través de cromatografía de intercambio aniónico de precipitados de sulfato amónico de plasma humano o fracciones Cohn IV, IV-1 o IV-4 derivadas de plasma humano. Se ha indicado que la precipitación en sulfato amónico elimina la transferrina, la albúmina y otras proteínas no deseables. Para este procedimiento es esencial que el sustrato del intercambio iónico es un sustrato del intercambio aniónico fuerte, tal como QAE-Sephadex® o GE celulosa. Este procedimiento no es adecuado para el aislamiento comercial a gran escala de Hp por las enormes cantidades de sal (sulfato amónico) contaminada que tendrían que eliminarse. Los procedimientos discontinuos de purificación usando un intercambiador aniónico tampoco son ideales para el escalado.

Se ha dado a conocer el aislamiento de HP del plasma de conejo precipitado en acetato sódico-ácido acético usando el sustrato de intercambio aniónico DE-52 celulosa microgranular (DEAE celulosa) (Basler y Burrell, 1983 Inflammation 7(4): 387-400). Fue necesario el Enfoque Isoeléctrico Preparativo para conseguir un grado razonable de pureza del producto. No obstante, aunque se indicó un rendimiento máximo de entre 50 y 70%, el análisis de los datos indica que el rendimiento fue, de hecho, 44% y la purificación sólo se triplicó. Este protocolo no es adecuado para usara escala comercial grande debido a su complejidad.

El documento JP2004-244348 divulga el aislamiento de Hp de la fracción humana IV usando cromatografía de intercambio aniónico.

Akaiwa y col. 1982, Anal. Biochem. Vol. 123(1): 178-182 divulga el aislamiento de Hp de suero de rata.

El documento US 2003/158391 divulga el aislamiento de Hp de componentes sanguíneos, tales como suero o plasma, mediante precipitación en sulfato amónico, purificación por cromatografía de afinidad o filtración en gel.

Es un objetivo de la presente invención mejorar que actualmente está disponible para el aislamiento de Hp en uno o más de los aspectos siguientes: rendimiento y/o pureza de Hp y reproducibilidad de los mismos, simplicidad del procedimiento e idoneidad para usar a una escala grande y/o comercial en términos de viabilidad económica.

Ahora se ha descubierto que la Hp se puede aislar a partir de una fracción de plasma humano previamente desconocido como fuente de Hp usando un sustrato de intercambio aniónico en un procedimiento simple que tiene como resultado rendimientos altos reproducibles y que se puede usar de forma económica a gran escala. Es importante el hecho de que el procedimiento de aislamiento puede usarse en la purificación de Hp para usos terapéuticos (es decir, el producto final es lo suficientemente puro y libre de contaminantes para administración a seres humanos).

El aislamiento de los componentes de plasma humano está bien documentado. Los procedimientos para el aislamiento de las proteínas, tales como albúmina e inmunoglobulinas, se han conocido durante muchos años. Una primera etapa común es el fraccionamiento del plasma. El procedimiento de fraccionamiento de uso más habitual es el método de Cohn (Cohn, E. J., y col., 1946 J. Am. Chem. Soc. 68: 459) y modificaciones del mismo (p. ej., Kistler y Nitschmann, 1962, Vox Sang, 7, p 414-24). Este procedimiento comienza con crioprecipitación para eliminar algunos de los factores de coagulación, seguido de tratamiento con celite. El conjunto de plasma resultante se trata con concentraciones crecientes de etanol para precipitar la fracción A + 1 (una combinación de las fracciones I, II y III) y la fracción IV. La disminución del pH del sobrenadante de la fracción IV y reducción de la temperatura de -5°C ( $\pm$  1°C) a -10°C ( $\pm$  3°C) produce la precipitación de la fracción V de Cohn.

Tradicionalmente, la fracción V de Cohn se ha considerado principalmente una fuente de albúmina. No obstante, actualmente se sabe que la fracción V de Cohn también es una fuente útil de Hp y, además, es una fuente de la que se puede aislar Hp con éxito y con relativa facilidad.

En un primer aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para el aislamiento de haptoglobina humana de la fracción V de Cohn humana, en el que dicho procedimiento comprende:

- a) cargar la fracción V de Cohn humana en un sustrato de intercambio aniónico y
- b) eluir de forma selectiva.

Por "haptoglobina (Hp)" se quiere decir todos los fenotipos (incluidas todas las isoterms) de Hp. La Hp huata aislada usando el procedimiento de la invención contendrá potencialmente todas las isoformas de Hp humana presentes en la muestra de partida. La composición exacta del aislamiento vendrá dictada, en último término, por los fenotipos de la fuente. En consecuencia, si se usan las muestras de plasma combinadas, se aislarán todas las isoformas. Se ha ideado una metodología para estudiar el polimorfismo de Hp (Typing of haptoglobin using the Phastsystem, Hansson y col., Nota de solicitud 373 para Phastsystem, Amersham Biosciences) y, por tanto, el experto podrá determinar qué isoformas están presentes en el aislamiento. El procedimiento se puede usar para determinar cuál de los diversos tamaños de las isoformas de Hp está presente. El uso de hemoglobina para unirse a haptoglobina y, por tanto, proporcionar

actividad de seudoperoxidasa que se puede detectar en un gel, se puede sustituir por transferencia de tipo western con detección de anticuerpos (inmunotransferencia).

Los autores han descubierto, a partir del uso de estas técnicas y otras, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (ensayo HPLC-SEC), ELISA de Hp, ensayo de unión a Hb y lecturas turbidimétricas, que las diferentes formas de Hp dan diferentes señales en los distintos ensayos. Por ejemplo, las formas de menor peso molecular de Hp dan una señal menor en el ELISA y una señal mayor mediante análisis turbidimétrico, que las formas de peso molecular mayor. Los ensayos de elección para comparar las cantidades de las diferentes formas son, por tanto, transferencias westem, HPLC-SEC y el ensayo de unión de Hb.

Se piensa que las diferentes isoformas de Hp tienen diferentes efectos biológicos como se demuestra en las observaciones *in vitro* y los estudios de población en ciertos estados de enfermedad. A partir de un estudio de estos datos, es probable que las formas de peso molecular menor aisladas de la fracción V tengan mayor efecto antiinflamatorio que las formas de peso molecular mayor. También queda claro a partir del análisis de una especie diferente de Hp que la unión a Hb humana puede ser específica de especie. El conocimiento de estas diferentes ha permitido la optimización del procedimiento de fraccionamiento y el acceso a diferentes isoformas de Hp para investigaciones *in vitro* y estudios de eficacia *in vivo*.

Por “aislamiento” se quiere decir que, preferentemente, al menos el 50% de la Hp humana presente en la fracción V de Cohn humana de la muestra de partida está presente en el producto del procedimiento de la invención. Preferentemente al menos el 65% y, más preferentemente, al menos 80% de la Hp humana presente en la muestra de partida está presente en el producto del procedimiento de la invención. La Hp humana obtenida usando el procedimiento de la invención tendrá una pureza de, al menos, un 70%, más preferentemente una pureza de, al menos, un 80%, y, más preferentemente, una pureza del 90%. Cabe destacar que, como tofos los procedimientos de aislamiento, los incrementos de pureza a menudo se asocian con disminuciones del rendimiento. Las etapas añadidas para garantizar la seguridad viral también pueden reducir la recuperación global.

El experto conocerá técnicas por las cuales se puede determinar la pureza/rendimiento de un aislamiento de Hp humano de la invención. Estos incluirían análisis de cromatografía HPLC-SEC (para las muestras que tienen un nivel de pureza superior al 40%), un ensayo de unión Hp-Hb (basado en el procedimiento de Katnik y col., 1995, *ibid*) bien en combinación con el ensayo de HPLC-SEC, cuando la muestra es lo suficientemente pura, o espectrofotometría a A280 con un coeficiente de extinción medio para proteínas plasmáticas (Hansson y col., Nota de solicitud 373 para Phastsystem, Amersham Biosciences). La actividad específica del producto también se puede determinar usando el ensayo de unión de Hb en combinación con HPLC-SEC y el coeficiente de extensión como se ha determinado a partir de la secuencia de aminoácidos.

Por “fracción V de Cohn” se quiere decir la fracción de plasma denominada fracción V de Cohn en el procedimiento de fraccionamiento de Cohn (Cohn, 1946, *ibid*) y cualquier modificación de dicho procedimiento, incluido el procedimiento modificado de Kistlery Nitschmann (1962, *ibid*). El experto entenderla con facilidad qué fracción es la fracción V Cohn y podría preparar esta fracción sin cargas innecesarias. Brevemente, este procedimiento puede implicar crioprecipitación del plasma, tratamiento con celite, exposición escalonada a etanol al 19% a pH 5,85 y a -5°C, etanol al 40% a Ph 5,85 y a -5°C y, por último a etanol al 40% a pH 4,8 y a -8°C, eliminándose el material precipitado en cada etapa. El precipitado final es la fracción V de Cohn. Cualquier fracción equivalente en términos de composición con respecto a la fracción V de Cohn obtenida de un modo alternativo o conocido mediante una terminología alternativa se considera dentro de la invención. El constituyente principal de la fracción V es albúmina.

Hp y la transferrina también están presentes en cantidades apreciables y se pueden detectar niveles bajos de glicoproteína ácida alfa 1. También hay cantidades mínimas de otras proteínas.

Por “muestra que comprende la fracción V de Cohn” se quiere decir que la mayoría de los componentes proteináceos de la muestra es fracción V de Cohn. Preferentemente, el único componente proteináceo de la muestra es fracción V de Cohn.

Por “cromatografía de intercambio aniónico” se quiere decir un procedimiento de cromatografía por el cual se consigue la separación en base a la carga, específicamente la carga negativa. La cromatografía de intercambio iónico usa un soporte sólido cargado al que se unen las moléculas da una muestra que se aplica al soporte sólido. Las moléculas no unidas pueden ser las moléculas diana y, por tanto, la etapa de intercambio iónico se puede considerar similar a una etapa de filtración que elimina las moléculas no deseadas.

Como alternativa, las moléculas diana pueden ser aquéllas que permanecen unidas, siendo las moléculas no unidas las no deseadas. Este último es el abordaje más frecuente, ya que la elución de las moléculas unidas del soporte sólido pueden controlarse/seleccionarse y, por tanto, se puede conseguir una calidad de producto mejor. Las técnicas de cromatografía de intercambio aniónico normalmente usan sustratos tales como, entre otros, dextrano, celulosa y modificaciones de los mismos, que están cargados positivamente. Estos sustratos pueden comprender parte del soporte sólido (p. ej., un recubrimiento) o pueden formar la totalidad del soporte sólido. El soporte sólido puede estar en forma particulada (p. ej., una resina), no obstante, se pueden usar soportes no particulados (p. ej., papeles de filtro o geles). Normalmente, aunque no siempre, los sustratos particulados se empaquetan en columnas.

Cuando se usa el término “sustrato” o la expresión “sustrato de intercambio aniónico”, se debe interpretar que hace referencia a sustratos en forma adecuada para usar en técnicas de intercambio aniónico.

Una muestra que se va a someter a cromatografía de intercambio aniónico se aplica al sustrato. Sobre la base de las interacciones de las caigas (cargas negativas), las moléculas de la muestra se unen al sustrato. Por tanto, el lavado del sustrato elimina las moléculas no unidas o débilmente unidas. Se puede realizar la elución controlada/selectiva de las moléculas unidas pasando las soluciones de concentración creciente de sales sobre el sustrato, ya que rompe las interacciones de carga entre el sustrato y las moléculas unidas. El pH de la solución de la elución se puede alterar para inducir la elución, ya que alterará la carga presente en la molécula unida y el sustrato. Cuando más débil es la interacción de las cargas entre la molécula y el sustrato, menor es la concentración de sal necesaria para romper la interacción y, por tanto, inducir la elución de dicha molécula del sustrato. Controlando cuidadosamente la concentración de sal se puede conseguir la elución selectiva de las moléculas unidas.

La fuerza de la interacción de las cargas se puede modificar mediante la elección de material para el soporte sólido. Por ejemplo, QAE-Sephadex® o GE celulosa son sustratos intercambiadores aniónicos fuertes, mientras que DEAE-celulosa y DEAE-Sephadex® son sustratos de intercambio aniónico débiles.

El experto conocerá bien las técnicas y herramientas de intercambio aniónico y podrá concebir y realizar protocolos específicos de sus necesidades. De utilidad concreta en el procedimiento de la invención son los sustratos de intercambio aniónico débiles y de utilidad excepcional es DEAE-Sephadex® (Amersham). Sephadex® es el nombre de uso habitual para las perlas de agarosa. Otras resinas de intercambio aniónico adecuadas incluyen perlas basadas en celulosa, dextrano y polímeros.

Por “débil” se quiere decir sustratos de intercambio aniónico con una capacidad tampón débil. La capacidad tampón de cualquier intercambiador aniónico concreto se puede determinar fácilmente mediante titulación ácido-base del sustrato, en la que la curva de titulación resultante indica la fuerza y la amplitud de la capacidad tampón.

Por tanto, en una realización preferida, el procedimiento de la invención comprende cromatografía de intercambio aniónico de la fracción V de Cohn humana usando un sustrato de intercambio aniónico débil.

En una realización más preferida, el procedimiento de la invención comprende cromatografía de intercambio aniónico de la fracción V de Cohn humana usando DEAE agarosa.

Normalmente, la fracción V de Cohn humana se cargará sobre el sustrato de intercambio aniónico en una solución de carga adecuada. El sustrato de intercambio aniónico y las condiciones de carga deberán ser tales que la Hp esté unida al sustrato, mientras que la albúmina, el constituyente principal de la fracción V de Cohn, permanece no unida o se une débilmente. Después, la albúmina puede eliminarse del sustrato usando un tampón de lavado adecuado antes de la elución selectiva de la Hp humana. Para facilitar el procesamiento, el sustrato de intercambio aniónico está, preferentemente, en forma de una columna. No obstante, el procedimiento de la invención no está limitado a la cromatografía en columna.

Asimismo, para facilitar el procesamiento, se usan, preferentemente, los mismos componentes en todos los diferentes tampones, variando solo cantidades o concentraciones de los componentes individuales entre los diferentes tampones.

También se pueden incluir una o más etapas de lavado para reducir las moléculas no deseadas en el eluato de la Hp humana. El objeto de una etapa de lavado es pasar un tampón adecuado por el sustrato que eluirá las moléculas no unidas, o unidas muy débilmente, de la fracción V de Cohn humana (p. ej., albúmina) sin inducir la elución de la molécula diana (Hp humana). Con mayor frecuencia, se incluirán una o más etapas de lavado entre la etapa de carga de la fracción V de Cohn humana sobre el sustrato de intercambio aniónico y la etapa de eluir la Hp humana del mismo. No obstante, las etapas de lavado se pueden incluir entre las distintas etapas de elución, especialmente si se van a eluir otras moléculas potencialmente útiles antes de la elución de Hp humana.

Muy preferentemente, el sustrato de intercambio aniónico se lava para eliminar el material no unido antes de eluir la Hp humana.

Por tanto, en una realización preferida, la invención se proporciona un procedimiento para el aislamiento de haptoglobina humana de la fracción V de Cohn humana, en el que dicho procedimiento comprende;

- a) cargar la fracción V de Cohn humana en un sustrato de intercambio aniónico,
- b) lavar el sustrato para eliminar los contaminantes no unidos o débilmente unidos.
- c) eluir selectivamente la Hp humana del sustrato de intercambio aniónico.

## ES 2 379 157 T3

En otro primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para el aislamiento de albúmina y haptoglobina humana de la fracción V de Cohn humana, en el que el procedimiento comprende:

- a) cargar la fracción V de Cohn humana en un sustrato de intercambio aniónico, seguido de
- b) lavar el sustrato para eliminar de forma selectiva la albúmina, y seguido de
- c) eluir selectivamente la Hp humana del sustrato.

El experto conocerá los tampones adecuados de carga, lavado y elución, y podrá formular tampones adecuados (en términos de constituyentes y sus concentraciones y pH) para conseguir cargar, lavar la Hp humana unida o eluir de forma selectiva la Hp humana del sustrato intercambiador de aniones concreto que se esté usando. El experto podrá optimizar estos parámetros sin cargas innecesarias. Se seleccionarán las condiciones de carga, lavado y elución de modo que no se produzcan daños innecesarios en la Hp humana. Tampones habituales de carga, lavado y elución comprenden un par de componentes tampón y una sal. Los pares de componente tampón adecuados incluyen, entre otros, acetato sódico y ácido acético, citrato sódico y ácido cítrico, ácido cítrico y fosfato sódico, y ácido succínico e hidróxido sódico. Un par de componentes tampón preferido es acetato sódico y ácido acético. Las sales adecuadas incluyen cloruro sódico, cloruro potásico y sulfato sódico. Una sal preferida es cloruro sódico.

Dado que se puede usar una amplia variedad de sales y componentes tampón, los tampones de carga, de lavado y de elución se pueden definir, como alternativa, en términos de su conductividad. El experto podrá formular tampones con cualquier sal y componente tampón siempre que se obtenga la conductividad correcta del tampón. El experto también apreciará que la conductividad requerida para cada tipo de tampón puede depender del sustrato de intercambio aniónico usado.

Los tampones de carga y de lavado suelen ser los mismos. Por tanto, la siguiente discusión sobre tampones de lavado es aplicable a los tampones de carga. No obstante, en caso necesario, el experto podrá concebir diferentes tampones de carga y de lavado a partir de sus conocimientos generales.

Para el lavado de un sustrato de intercambio aniónico débil al que está unida la Hp humana sin producir una elución significativa de la Hp humana, se prefiere una conductividad de entre 0,1 a 3,0 mS/cm, más preferentemente la conductividad será entre 0,5 a 2,5 mS/cm y, más preferentemente, entre 1,0 y 2,0 mS/cm.

Para el lavado de Hp humana unida DEAE Sepharose® sin producir una elución significativa de la Hp humana, se prefiere una conductividad de entre 0,7 a 2,7 mS/cm, más preferentemente la conductividad será entre 1,1 a 2,3 mS/cm y, más preferentemente, entre 1,2 y 2,2 mS/cm.

A modo de ejemplo, un tampón de lavado con esta conductividad más preferida comprende acetato sódico 5 mM y cloruro sódico 15 mM ajustado a un pH 4,6 con ácido acético.

Para la elución de Hp humano de un sustrato de intercambio aniónico débil se prefiere una conductividad de entre 8,0 y 15,0 mS/cm, más preferentemente la conductividad será entre 9,5 y 13,5 mS/cm y, más preferentemente, entre 10,5 y 12,5 mS/cm.

Para la efusión de Hp humana de DEAE Sepharose® se prefiere una conductividad de entre 9,0 a 14,0 mS/cm, más preferentemente la conductividad será entre 10,0 a 13,0 mS/cm y, más preferentemente, entre 10,5 y 12,5 mS/cm. A modo de ejemplo, un tampón de elución con esta conductividad más preferida comprende acetato sódico 5 mM y cloruro sódico 113,5 mM ajustado a un pH de 4,6 con ácido acético.

El pH de los tampones de carga, lavado y elución es también importante. El pH puede alterar la conductividad del tampón en función de los constituyentes del tampón usados y también pueden inducir la elución (deseada o no) de la molécula diana del sustrato. En el caso de los tampones de lavado para el lavado de la Hp humana unida a un intercambiador aniónico débil se prefiere un intervalo de pH de entre 3 y 7. Más preferido es un pH entre 4 y 6, más preferentemente es un pH entre 4,2 y 5,0. Para un tampón que comprende acetato sódico 5 mM y cloruro sódico 15 mM a una conductividad de  $1,7 \pm 0,5$  mS/cm, el pH sería  $4,6 \pm 0,1$  (ajustado con ácido acético). En el caso de la elución de Hp humana de un intercambiador aniónico débil se prefiere un intervalo de pH de entre 3 y 7. Más preferido es un pH entre 4 y 6, y más preferible es un pH de entre 4,2 y 5,0. Para un tampón que comprende acetato sódico 5 mM y cloruro sódico 113,5 mM a una conductividad de  $11,5 \pm 1,0$  mS/cm, el pH sería  $4,6 \pm 0,1$  (ajustado con ácido acético). El experto conocerá la relación entre pH y conductividad y entre el pH y el grado de elución, y podrá predecir intervalos de pH precisos que son adecuados para los tampones y sustratos que se estén usando y la función que están realizando. Además, el conocimiento general común permitirá la optimización de los parámetros del tampón sin cargas indebidas.

En una realización más preferida, la invención proporciona un procedimiento para el aislamiento de haptoglobina I humana de la fracción V de Cohn humana, en el que dicho procedimiento comprende:

- a) aplicar la fracción V de Cohn humana a un sustrato de intercambio aniónico de DEAE agarosa,

- b) lavar dicho sustrato con un tampón de lavado de acetato sódico/ácido acético/cloruro sódico de una conductividad entre 1,2 y 2,3 mS/cm y un pH entre 4,5 y 4,7 y
- c) eluir la haptoglobina humana de dicho sustrato con un tampón de lavado/elución de acetato sódico/ácido acético/cloruro sódico de una conductividad entre 10,5 y 12,5 mS/cm y un pH entre 4,5 y 4,7.

Dependiendo de los otros constituyentes presentes en la fracción V de Cohn humana, puede ser necesario llevar a cabo la elución escalonada para obtener la Hp humana con un grado alto de pureza. Los contaminantes que se unen al sustrato con menos fuerza que la Hp humana pueden eluir primero mediante la elección adecuada de las condiciones de elución iniciales. De un modo similar, el tampón de elución usado para eluir la Hp humana deberá escogerse de modo que no elimine los contaminantes que se unen al sustrato con mayor fuerza que la Hp humana. Por ejemplo, la albúmina y la transferrina se unen a DEAE Sefarosa más débilmente que la Hp y eluyen antes que la Hp. Por otro lado, se ha descubierto que la  $\alpha$ 1-ácido glicoproteína (AAG) se une con mayor fuerza a DEAE Sefarosa que la Hp y puede permanecer unida a la columna después de eluir la Hp. En general, cuanto mayor carga negativa tiene una proteína concreta, con mayor fuerza se unirá a la resina de intercambio aniónico y mayor será la concentración de sal que es necesario eluir. Cualquier proteína eluida distinta a la Hp humana se puede descartar o, si es potencialmente útil, se puede conservar para un procesamiento posterior.

El experto conocerá técnicas para monitorizar el eluato para permitir seguir el progreso de la elución y determinar lo que se está eluyendo en las diversas fracciones. Por ejemplo, mediante espectroscopia UV se puede seguir el progreso de la elución en tiempo real. Se pueden usar técnicas, tales como cromatografía HPLC SEC o SDS PAGE, para detectar la presencia y la identidad de las impurezas. También se puede usar espectrometría de masas de desorción/ionización con láser asistida con matriz-tiempo de vuelo (MALDI-ToF) de las fracciones de HPLC o de las bandas de SDS-PAGE para identificar las proteínas presentes. Las proteínas conocidas se pueden monitorizar con procedimientos de detección basados en anticuerpos (p. ej., ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), difusión inmunoradial (RID) y determinaciones turbidimétricas).

El procedimiento de la invención también se puede usar para alcanzar la separación y aislamiento de isoformas concretas de Hp humana. La separación se puede conseguir en base a la carga. Estas diferencias en la carga son, probablemente, un resultado de varios patrones de glicosilación en las diferentes isoformas. Cuanto menor es la carga negativa de una isoforma, menor es la concentración de sal necesaria para eluir dicha isoforma. Normalmente, las concentraciones de sal aumentan durante el curso de la etapa de elución y, de este modo, las isoformas con menos carga negativa eluyen primero. Monitorizando el eluato de un modo estándar, el experto podrá identificar pequeños picos de elución que corresponden a las isoformas pequeñas y, en consecuencia, aíslan las isoformas pequeñas.

Por tanto, en otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para el aislamiento de isoformas de haptoglobina humana individuales de la fracción V de Cohn humana, en el que dicho procedimiento comprende cromatografía de intercambio aniónico de dicha fracción V de Cohn humana.

El uso de la fracción V de Cohn humana como material de partida puede también tener un efecto sobre las isoformas de Hp humana que se aíslan en última instancia. Se ha descubierto que las proporciones de los fenotipos de la Hp presentes en la fracción IV y la fracción V del proceso de fraccionamiento de Cohn difieren. Por tanto, al aislar la Hp humana de la fracción V humana se puede producir un producto de Hp diferente al producto de Hp producido usando la fracción IV humana. Específicamente, se ha descubierto que la proporción de la isoforma 1-1 es superior a la proporción de las isoformas 2-2 en el producto derivado de la fracción V humana cuando se compara con un producto derivado de la fracción IV humana. Esto se postula como un resultado de la precipitación de las isoformas más pesadas, ya que el Ph se reduce a una concentración de etanol alta durante el proceso de fraccionamiento.

Las realizaciones de la invención preferidas anteriormente se aplican *mutatis mutandis* a este aspecto de la invención. Al considerar el término “aislamiento” en este aspecto, se tiene que tener en cuenta que cualquier rendimiento se debe calcular con respecto a la isoforma concreta.

Un problema grave de los procedimientos de la técnica anterior para el aislamiento de Hp de plasma ha sido su falta de idoneidad para escalar a un aislamiento comercial/a gran escala. Como se puede ver a partir de los ejemplos, ahora se ha descubierto que la cromatografía de intercambio aniónico se puede usar para conseguir una preparación de alto rendimiento alto y pureza elevada de Hp humana a partir de la fracción V de Cohn humana sin la necesidad de posteriores etapas de procesamiento, tales como Enfoque isoeléctrico Preparativo. Por tanto, el procedimiento de la invención se puede usar a escala grande/comercial y ser económicamente viable a dicha escala.

Por “gran escala” se quiere decir que se puede conseguir aislamiento a partir de volúmenes de la muestra de partida del orden de miles de litros. Como alternativa, gran escala hace referencia a los tamaños de lote de plasma de partida de al menos 1.000 litros, más preferentemente al menos 3.000 litros y, más preferentemente, al menos 6.000 litros.

Las realizaciones de la invención preferidas anteriormente se aplican *mutatis mutandis* a este aspecto de la invención. El experto podrá aplicar las realizaciones comentadas anteriormente a la producción a gran escala sin cargas innecesarias.

La cromatografía de intercambio aniónico se puede usar para aislar una proporción significativa de la Hp humana en la fracción V de Cohn humana. El producto directo de la etapa de intercambio aniónico del procedimiento de la invención se puede someter a procedimientos para purificarlo adicionalmente y/o a concentrar la preparación. El experto conocerá y podrá aplicar procedimientos adecuados o idear alternativas. Ejemplos de procedimientos adecuados incluyen, entre otros, diafiltración, ultrafiltración, cromatografía de flujo, cromatografía de quelatos metálicos, cromatografía de hidroxiapatita y procedimientos específicos de reducción/inactivación de virus.

Si la Hp está destinada a uso farmacéutico, la Hp aislada y/o purificada puede tener que sufrir un procesamiento adicional para eliminar cualquier contaminante químico o biológico que puede quedar en la muestra. Dichos procedimientos son bien conocidos en la técnica y el experto podría aplicar este conocimiento general habitual y realizar pruebas de rutina para permitirle formular la Hp aislada/purificada para que sea adecuada para uso farmacéutico.

Por ejemplo, se ha descubierto que un procedimiento eficaz de purificación adicional de Hp es mediante el uso de absorbentes para cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH). Se investigaron varios absorbentes de CIH, tales como fenilsefariosa (de sustitución alta, de sustitución baja y de alto rendimiento), butil sefariosa y octil sefariosa. En todos los casos, se descubrió que la Hp se unía con menos fuerza que los contaminantes. El experto podría escoger un ligando de CIH adecuado para sus necesidades y sabrá que modificando la fuerza iónica de los tampones de alimentación y equilibrado, podrían recogerse moléculas con afinidades diferentes por un ligando de CIH en fracciones diferentes. Por ejemplo, puede preferirse escoger condiciones en las que la Hp fluya mientras los contaminantes quedan unidos, mientras que en otras situaciones puede ser cierta (a situación contraria. El experto podría también conocer los factores que afectan a la purificación por CIH, tal como el pH y el tiempo de residencia. El tiempo de residencia es especialmente crítico en los casos en los que el producto está en el flujo pasante. Esto es porque los tiempos de residencia más cortos pueden permitir que los contaminantes fluyan, de modo que se contamina el producto.

Los tampones de CIH adecuados tienen una concentración de sulfato amónico de entre 0,5 M y 1,5 M, preferentemente entre 0,8 M y 1,2 M y, más preferentemente, entre 0,9 M y 1,1 M, y un pH de entre 5 y 9, preferentemente entre 6 y 8, y, más preferentemente, entre 6,5 y 7,5. Velocidades de flujo adecuadas para CIH no serían mayores de 10 cm/min, preferentemente entre 0,5 y 5 cm/min y, más preferentemente, entre 1 y 3 cm/min.

Se puede usar diafiltración para ajustar la concentración de sal o el pH de modo que sean adecuados para uso farmacéutico. Los contaminantes biológicos, como virus o priones, se pueden eliminar mediante técnicas de filtración de virus conocidas, mediante técnicas de desinfección química conocida (inactivación viral) y/o mediante técnicas de pasteurización o tratamiento térmico. Por ejemplo, los inventores han descubierto que la eliminación y/o inactivación de virus a gran escala de una solución que contiene Hp es posible usando tratamiento con detergente disolvente, tal como se indica en el documento EP-A-0131740, lo que proporciona que la Hp se trata a un pH en el intervalo de pH de 5-9. También es posible filtrar la Hp producida mediante los procedimientos de purificación descritos en el presente documento a través de uno o más filtros de virus adecuados, por ejemplo filtros con tamaños de poro de aproximadamente 20 nm y, por tanto, en teoría, garantizar la eliminación de virus potencialmente patógenos. Si se usa tratamiento con detergente disolvente para inactivar virus, se puede incluir una etapa adicional en el procedimiento para eliminar los reactivos de detergentes disolventes. El experto estaría muy familiarizado con dichos procedimientos. A modo de ejemplo, se puede usar cromatografía de intercambio aniónico. Una etapa adecuada de cromatografía de intercambio aniónico sería la misma que las comentadas en el presente documento en relación con la purificación inicial de la Hp humana. Más específicamente, una etapa de eliminación con reactivo de detergente disolvente podría comprender diluir la muestra tratada con el detergente disolvente de un modo adecuado para mantener la conductividad por debajo de 3 mS/cm, cargando la muestra tratada sobre un sustrato de intercambio aniónico (por ejemplo, un sustrato de DEAE agarosa), lavando el sustrato para eliminar de forma selectiva los contaminantes no unidos o débilmente unidos y eluir de forma selectiva la Hp del sustrato de intercambio aniónico. El uso de cromatografía de intercambio aniónico para la eliminación de los reactivos de detergente disolvente también pueden conducir a mejorar la pureza del producto final.

Si se usa pasteurización o tratamiento térmico, se contempla el uso de estabilizantes. Los estabilizantes incluirían, entre otros, azúcares, alcoholes de azúcar, ácido ascórbico y aminoácidos. Los procedimientos para eliminar estabilizantes, en caso necesario, son bien conocidos en la técnica. Si se usa un desinfectante químico (p. ej., disolvente/detergente), es probable que también necesite eliminación. Los procedimientos para eliminar desinfectantes químicos son bien conocidos en la técnica. El orden concreto de los procedimientos mencionados anteriormente no se considera importante, no obstante, órdenes concretos pueden ser más ventajosos que otros en términos de rapidez y costes. Por ejemplo, puede ser preferible realizar pasteurización con estabilizantes o efectuar una etapa de desinfección química antes de una etapa de filtración o diálisis que podría diseñarse para eliminar los estabilizantes o el agente de desinfección. Productos sanguíneos para usar como productos farmacéuticos sufrirán, al menos, dos etapas de inactivación viral. Posteriormente, la HP puede formularse para uso clínico.

En una formulación de Hp adecuada para uso farmacéutico, la Hp deberá carecer sustancialmente de contaminantes químicos y biológicos, en la medida en que los niveles en la formulación no se consideren dañinos para un paciente. Idealmente, los niveles de cualquier contaminantes serán sustancialmente menores que los niveles mínimos requeridos por los organismos reguladores relacionados con productos farmacéuticos.

Por "contaminantes biológicos" se quiere decir entidades biológicas capaces de inducir enfermedades en un paciente. Dichas entidades incluyen, entre otros, virus, priones, bacterias, hongos, esporas y células.

## ES 2 379 157 T3

Por “contaminantes químicos” se quiere decir moléculas que inducirían reacciones adversas si se administran a pacientes.

Cualquiera y todas las combinaciones de características preferidas tratadas en el presente documento entran dentro de la invención, incluso si no se divulga explícitamente. La invención se describirá adicionalmente con referencia a las Figuras siguientes, en las que:

La Figura 1 muestra los resultados de un ejemplo de experimento de aislamiento de Hp a escala de laboratorio. Las tres marcas corresponden a la conductividad (Cond.), pH (pH) y absorbancia UV (UV). Los picos de elusión de proteínas son albúmina R/T marcada, pico 1 Hapto, pico 2 Hapto y AAG ( $\alpha$ 1-ácido glicoproteína).

La Figura 2 muestra el análisis HPLC de los picos de Hp (pico 1 y pico 2) para Hapto 011. Figura 2a, pico 1. Figura 2b, pico 2.

La Figura 3 muestra los resultados de un ejemplo de experimento de aislamiento de Hp a escala comercial (Ciclo de producción). Las tres marcas corresponden a la conductividad (Cond.), pH (pH) y absorbancia UV (UV).

La Figura 4 muestra el análisis HPLC de los picos de Hp (pico 1 y pico 2) para el Ciclo de producción. Figura 4a, pico 1. Figura 4b, pico 2.

### Ejemplo 1

#### *Preparación de la fracción V de Cohn*

El plasma se sometió a una descongelación controlada a  $-0,5^{\circ}\text{C}$  a  $2^{\circ}\text{C}$  durante la cual precipitan algunas proteínas. El sobrenadante se recogió, se trató con celite y después se filtró para eliminar otras proteínas no deseadas. El sobrenadante resultante se ajustó a un pH de 5,85 con tampón acetato y se añadió 17-21% de etanol en v/v. La temperatura se controló durante la precipitación posterior a entre  $-4^{\circ}\text{C}$  y  $-6^{\circ}\text{C}$ . Estas condiciones son similares a las usadas en la segunda etapa del procedimiento de Kistfer y Nitschmann y, de este modo, el precipitado incluye la fracción 1 y el precipitado A de dicho procedimiento. El precipitado se denomina A+1. El sobrenadante se fraccionó después mediante el ajuste de la concentración de etanol a entre 38 y 42%. Las proteínas precipitadas se conocen, en conjunto, como fracción IV en el proceso de Kistier y Nitschmann. El ajuste del pH a 4,85 y la temperatura a entre  $-7^{\circ}\text{C}$  y  $-13^{\circ}\text{C}$  produjo la precipitación de la fracción V.

### Ejemplo 2

#### *Columnas de intercambio aniónico y preparación de tampones y soluciones*

##### Columnas:

Ejemplos 1 y 2, DEA Sepharose<sup>®</sup> (Amersham), de 12,5 cm de altura de lecho en una columna 16/20 XK de Amersham.

Ejemplos 3 y 4, columna DEA Sepharose<sup>®</sup> (Amersham) a escala comercial.

##### Tampón de equilibrado/lavado:

acetato sódico 5 Mm, analar (0,68 g/l de acetato sódico trihidrato).

Cloruro sódico 15 mM, analar (0,88 g/l).

pH:  $4,6 \pm 0,1$  (pH ajustado con ácido acético glacial, analar).

Conductividad:  $1,7 \pm 0,5$  mS/cm.

Para 400 litros de tampón de equilibrado/lavado, 272 g de acetato sódico trihidrato, 351 g de cloruro sódico y 110 g de ácido acético glacial se añadieron a un vaso adecuado (de una capacidad mínima de 500 l). Los ingredientes se disolvieron y llevaron hasta 400 l con agua adecuada. Se comprobaron las lecturas de pH y conductividad. Intervalo de aceptación del pH 4,5-4,7. Conductividad: 1-2 mS/cm.

##### Tampón de elución de Hp

acetato sódico 5 Mm, analar (0,68 g/l de acetato sódico trihidrato).

Cloruro sódico 113,5 Mm (6,63 g/l).

## ES 2 379 157 T3

pH: 4,6  $\pm$ : 0,1.

Conductividad: 11,5:  $\pm$  1 mS/cm.

5 Para 500 litros de tampón de elución, 340 g de acetato sódico trihidrato, 3,32 kg de cloruro sódico y 110 g de ácido acético glacial se añadieron a un vaso adecuado (de una capacidad mínima de 500 l). Los ingredientes se disolvieron y llevaron hasta 500 l con agua adecuada. Se comprobaron las lecturas de pH y conductividad. Intervalo de aceptación del pH 4,5-4,7. Conductividad: 10,5-12,5 mS/cm.

10 Tampón de elución de AAG

acetato sódico 5 Mm, analar (0,68 g/l de acetato sódico trihidrato).

Cloruro sódico 212 Mm (12,40 g/l).

15 pH: 4,6  $\pm$ : 0,1.

Conductividad: 19,5  $\pm$ ; 2,5 mS/cm.

20 Para 400 litros de tampón de elución de AAG, 272 g de acetato sódico trihidrato, 4,96 kg de cloruro sódico y 110 g de ácido acético glacial se añadieron a un vaso adecuado (de una capacidad mínima de 500 l). Los ingredientes se disolvieron y llevaron hasta 400 l con agua adecuada. Se comprobaron las lecturas de pH y conductividad. Intervalo de aceptación del pH 4,5-4,7. Conductividad: 17-22 mS/cm.

### 25 Ejemplo 3

#### *Aislamiento de Hp a escala de laboratorio*

30 El aislamiento de Hp de la fracción V de Cohn se realizó a escala de laboratorio. El sustrato de intercambio aniónico DEAE-Sephacel® Fast Flow se empaquetó a una altura de lecho de 12,5 cm en una columna de 25 ml alijada en una columna 16/20 XK de Amersham BioSciences. Esta es una versión a escala (1/4.000) de una columna de escala comercial.

35 La solución de la fracción V de Cohn se cargó en la columna. La carga de la fracción V de Cohn se redujo de 250 ml a 150 ml para ahorrar tiempo de procesamiento. Después de completada la carga, la columna se lavó con tampón de equilibrio. La albúmina eluyó en el flujo pasante de la carga. Después, se indujo la elución de Hp pasando el tampón de elución por la columna. El caudal de los tampones se mantuvo a 4,0 ml/min a lo largo de todo el proceso. La figura 1 muestra la presencia de proteína en el eluato, como se monitoriza mediante absorbancia UV como función del volumen del paso del tampón a través de la columna. La conductividad y el pH del eluato también se muestran. Como 40 se puede ver, la Hp eluyó en forma de dos picos después de la elución de la albúmina.

Las muestras correspondientes a los dos picos de Hp se analizaron después mediante HPLC. La Figura 2 muestra que el pico 1 (Figura 2a) tenía más Hp 1-1 que las otras formas y que el Pico 2 (Figura 2b) era más rica en las formas Hp mayores (Hp-2-2 y 2-1) que el Pico 1. En este ejemplo, para el pico 1, el factor de purificación se multiplicó por 45 40, la pureza fue del 72% y el rendimiento del 80%. El pico 2 tenía una pureza del 40%.

### Ejemplo 4

#### 50 *Aislamiento de Hp a gran escala*

El aislamiento de Hp de la fracción V de Cohn se realizó a escala comercial usando una columna de DEAE-Sephacel® a una escala de producción completa (columna de 100 litros). La solución de la fracción V de Cohn se cargó en la columna (1.100 litros). Después de completada la carga, la columna se lavó con tampón de lavado. Esto 55 produjo la elución de la albúmina. Después, se eluyó la Hp con tampón de elución. El caudal de los tampones se mantuvo a 14 litros/min, que es equivalente a 4,0 ml/min a escala de laboratorio. La figura 3 muestra la presencia de proteína en el eluato (como se monitoriza mediante absorbancia UV) como función del volumen del paso del tampón a través de la columna. El cromatograma comienza al principio del pico de elución de la albúmina. Como se puede ver, la Hp eluyó en forma de dos picos una vez eluida la albúmina. La similitud de esta traza en comparación con el 60 experimento a escala de laboratorio destacó la idoneidad del procedimiento de la invención para pasar al aislamiento a escala comercial de la Hp.

Las muestras correspondientes a los dos picos de Hp se analizaron después mediante HPLC. La Figura 4 muestra que el pico 1 (Figura 4a) tenía más Hp 1-1 que las otras formas y que el Pico 2 (Figura 4b) era más rica en las formas Hp mayores (Hp-2-2 y 2-1) que el Pico 1. La pureza del pico 1 fue del 67%, la del pico 2 fue menor. El rendimiento del pico 1 fue de aproximadamente 74%. Como solo se tomó una muestra del pico dos, el rendimiento de este pico 65 no se pudo evaluar. Además, al comparar los resultados analíticos de la producción con los resultados analíticos, se puede ver que el escalado no afecta a la calidad del producto.

## Ejemplo 5

*Purificación de Hp sobre butil sefarosa*

5 La fracción de Hp obtenida del Ejemplo 4 (pico 1) se purificó además sobre butil sefarosa. Una columna HiPrep™ Butyl ff de 20 ml preempaquetada se equilibró con 180 ml de sulfato amónico 1,0 M en tampón de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM a pH 7,0 a un caudal de 4,5 ml/min (135 cm/h). Después, 40 ml del pico 1 del Ejemplo 4 se cargaron a 3,5 ml/min. A continuación, la columna se lavó con 20 ml del tampón de equilibrado. El flujo pasante y el lavado (producto haptoglobina) se recogieron en un vaso. Las moléculas unidas (contaminantes) se eliminaron de la columna mediante  
10 lavado con agua desionizada. El flujo pasante (Hp) se analizó mediante HPLC-SEC. Desde las áreas de los picos, el 98% de la proteína total era Hp y el 67 % era Hp con un peso molecular de aproximadamente 100 kDa.

Se realizaron experimentos análogos usando columnas de fenilsefarosa y octilsefarosa de sustitución alta, de sustitución baja y de alto rendimiento. La fenil sefarosa de alto rendimiento dio una pureza del 99% y un rendimiento del  
15 32%. Los absorbentes restantes dieron purezas de entre 96% y 97% y rendimientos de entre 32% y 61%.

Los experimentos de optimización usando HiPrep™ Butyl ff han mostrado que a) el pH debería estar entre 6 y 8, b) la concentración de sulfato amónico deberá estar entre 0,8 M y 1,2 M, c) el caudal de carga deberá ser de 1 a 3  
20 cm/min.

## Ejemplo 6

*Estabilidad de Hp*

25 Se ha demostrado que la Hp producida mediante los procedimientos de la invención es resiliente a un amplio abanico de condiciones de pH, lo que hace que los posteriores esquemas de purificación que requieren condiciones ácidas o alcalinas sean viables. En un ejemplo, se incubaron 3 ml de Hp del pico 1 del Ejemplo 4 con 3 ml de tampón (glicina 200 mM para pH 2, 3 y 4, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 200 mm para pH 11). Las muestras se recogieron a 0, 4, 7, 24, 48 y  
30 72 horas. Las muestras se neutralizaron de inmediato con Tris-HCl 1M a pH 7,0. Después, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE con tinción de plata y los resultados del análisis mostraron que la Hp puede aguantar un intervalo de pH de 4-11 durante 72 horas. No obstante, a pH 2 se produjo agregación completa en un plazo de 4 horas y a pH 3 se observó degradación parcial (como ponen de manifiesto las bandas adicionales en la SDS-PAGE).

35 También se ha demostrado que la Hp producida mediante los procedimientos de la invención es estable a 4°C durante períodos superiores a 18 meses con la adición de proteína, monosacárido o disacárido alguno como excipiente. Las temperaturas extremas, específicamente las superiores a 40°C, producen agregación de Hp tras un período corto o más largo, dependiendo de la temperatura. Por ejemplo, la incubación de Hp a 60°C durante 24 horas tuvo como  
40 resultado la agregación completa, como muestra la HPLC-SEC.

## Ejemplo 7

*Tratamiento de la Hp con detergente disolvente*

45 El pico 1 del Ejemplo 4 se trató con detergente disolvente siguiendo el procedimiento de la patente número EP-A 0131740. En resumen, 4,32 g de polisorbato 20, 1,16 g de tri-n-butilfosfato (TnBP) y 14,52 g de WFI (agua para inyectables) se mezclaron enérgicamente durante 15 minutos. A 150 ml del pico 1 del ejemplo 4 se añadieron 8,7 g de esta mezcla y se incubó a 25°C durante 30 minutos. Después, la mezcla se diluyó con 475 ml de WFI. A continuación,  
50 la muestra diluida se cargó sobre una columna de DEAE de 30 ml con tampones como se han usado en el Ejemplo 3. Las moléculas no unidas y los reactivos de detergente disolvente (DD) se eliminaron de la columna mediante lavado. La Hp se eluyó como en el Ejemplo 3. La Hp obtenida se analizó mediante a) SDS-PAGE, que demostró que se habían eliminado la mayoría de los contaminantes, y mediante b) ensayo de unión de hemoglobina, que demostró que en el producto se había recuperado el 63% de la Hp activa. El 37% restante se perdió durante la etapa de lavado, de modo  
55 que se demuestra que el tratamiento con DD no afecta a la actividad de la Hp.

También es posible filtrar la Hp producida mediante los procedimientos de purificación descritos en el presente documento a través de uno o más filtro(s) de 20 nm. de modo que, en teoría, garantiza la eliminación de virus potencialmente patógenos, incluidos los virus sin cubierta, que pueden no haberse inactivado con el tratamiento con  
60 DD.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el aislamiento de haptoglobina humana (Hp) de la fracción V de Cohn humana, en el que dicho procedimiento comprende:
  - a) cargar dicha fracción V de Cohn humana en un sustrato de intercambio aniónico, y
  - b) eluir de forma selectiva la Hp humana del mismo.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que todas las isoformas de Hp humana presentes en la fracción V de Cohn humana se aíslan de la fracción V de Cohn humana.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho procedimiento comprende cromatografía de intercambio aniónico de dicha fracción V de Cohn humana usando un sustrato de intercambio aniónico débil.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho sustrato de intercambio aniónico débil es DEAE agarosa.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho procedimiento comprende:
  - a) cargar la fracción V de Cohn humana en un sustrato de intercambio aniónico,
  - b) lavar el sustrato para eliminar los contaminantes no unidos o débilmente unidos.
  - c) eluir selectivamente la Hp humana del sustrato de intercambio aniónico.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las etapas de carga y de lavado usan tampones de conductividad de entre 0,1 y 3,0 mS/cm.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que las etapas de carga y de lavado usan tampones de conductividad de entre 1,0 y 2,0 mS/cm.
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las etapas de carga y de lavado usan tampones de pH entre 3 y 7.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que las etapas de carga y de lavado usan tampones de conductividad de entre 4,2 y 5,0.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la etapa de elución usa tampones de conductividad de entre 8,0 y 15,0 mS/cm.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la etapa de elución usa tampones de conductividad de entre 10,5 y 12,5 mS/cm.
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la etapa de elución usa tampones de pH entre 4 y 6.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la etapa de elución usa tampones de pH de entre 4,2 y 5,0.
14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que los tampones de carga y/o de lavado y/o de elución comprenden acetato sódico, ácido acético y cloruro sódico.
15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicho procedimiento comprende:
  - a) aplicar dicha fracción V de Cohn humana a un sustrato de intercambio aniónico de DEAE agarosa,
  - b) lavar dicho sustrato con un tampón de lavado de acetato sódico/ácido acético/cloruro sódico de una conductividad entre 1,2 y 2,3 mS/cm y un pH entre 4,5 y 4,7, y
  - c) eluir la Hp humana de dicho sustrato con un tampón de elución de acetato sódico/ácido acético/cloruro sódico de una conductividad entre 10,5 y 12,5 mS/cm y un pH entre 4,5 y 4,7.

## ES 2 379 157 T3

16. Un procedimiento para el aislamiento de isoformas de Hp humana individuales de la fracción V de Cohn humana, en el que dicho procedimiento comprende cromatografía de intercambio aniónico de dicha fracción V de Cohn humana.

17. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que el eluato se monitoriza para identificar la elusión de isoformas de Hp humana discretas.

18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la isoforma Hp1-1 humana se conserva en el producto final.

19. Un procedimiento para el aislamiento de albúmina y haptoglobina humana de la fracción V de Cohn, en el que dicho procedimiento comprende:

a) cargar la fracción V de Cohn humana en un sustrato de intercambio aniónico, seguido de

b) lavar el sustrato para eliminar de forma selectiva la albúmina, y seguido de

c) eluir selectivamente la haptoglobina humana del sustrato.

20. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que dicho procedimiento comprende además al menos una etapa de concentración y/o purificación.

21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la al menos una etapa de concentración y/o purificación se selecciona de diafiltración, ultrafiltración, cromatografía de flujo pasante, cromatografía de quelatos metálicos y cromatografía con hidroxipatita.

22. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la al menos una etapa de purificación es cromatografía de interacción hidrofóbica.

23. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que dicho procedimiento comprende además al menos una etapa de eliminación de contaminante.

24. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, en el que dicha etapa de eliminación de contaminante es una etapa de inactivación o eliminación de virus.

25. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 24, en el que dicha etapa de inactivación o eliminación de virus comprende tratamiento con detergente disolvente y/o filtración de virus.

26. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, que comprende:

(a) cromatografía de intercambio aniónico de la fracción V de Cohn humana;

(b) inactivación del virus mediante tratamiento con detergente disolvente y eliminación por cromatografía de los reactivos de detergente disolvente;

(c) filtración de virus; y

(d) formulación en un tampón fisiológico;

en el que la etapa (b) y la etapa (c) pueden tener lugar en cualquier orden.

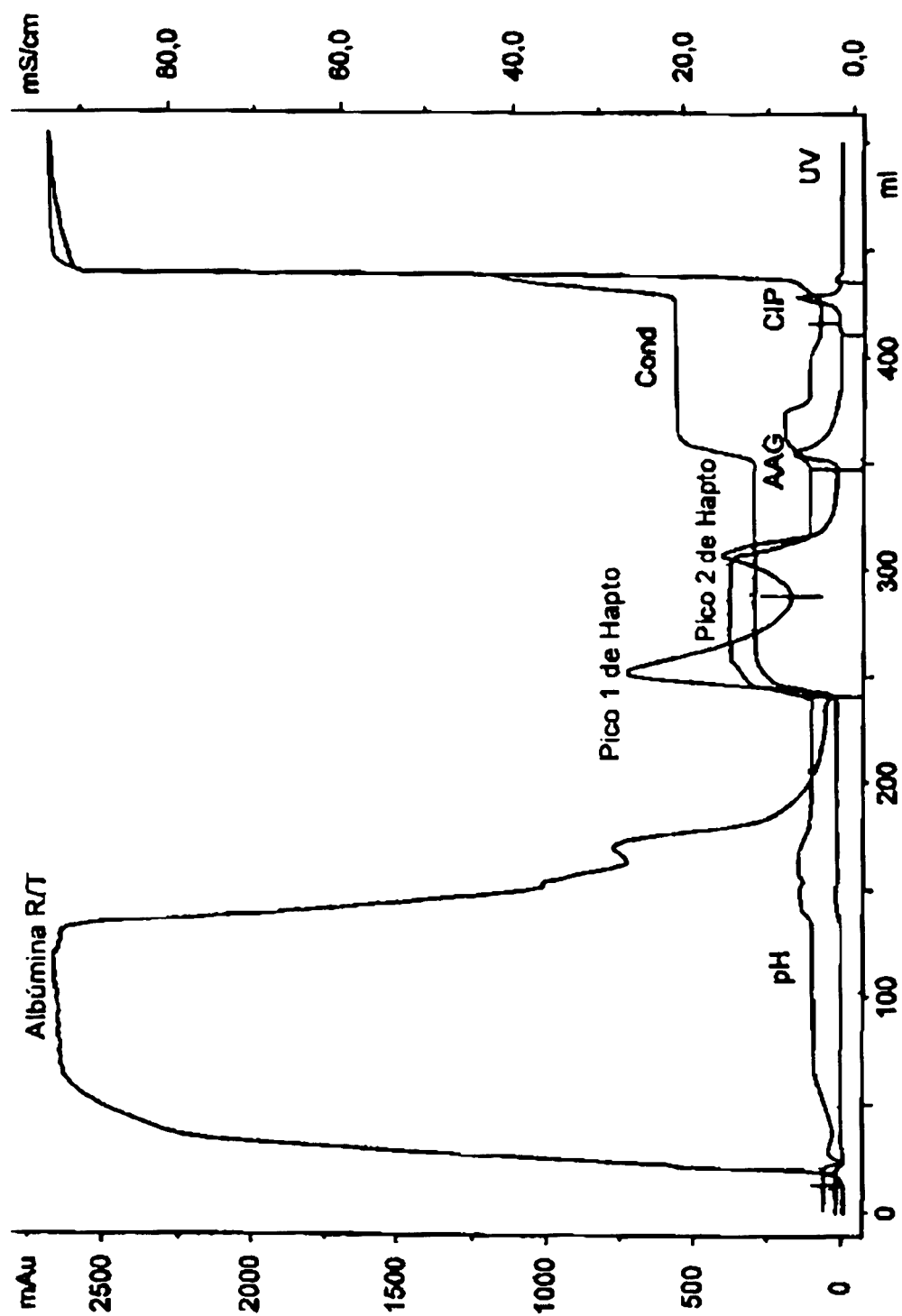


FIG. 1

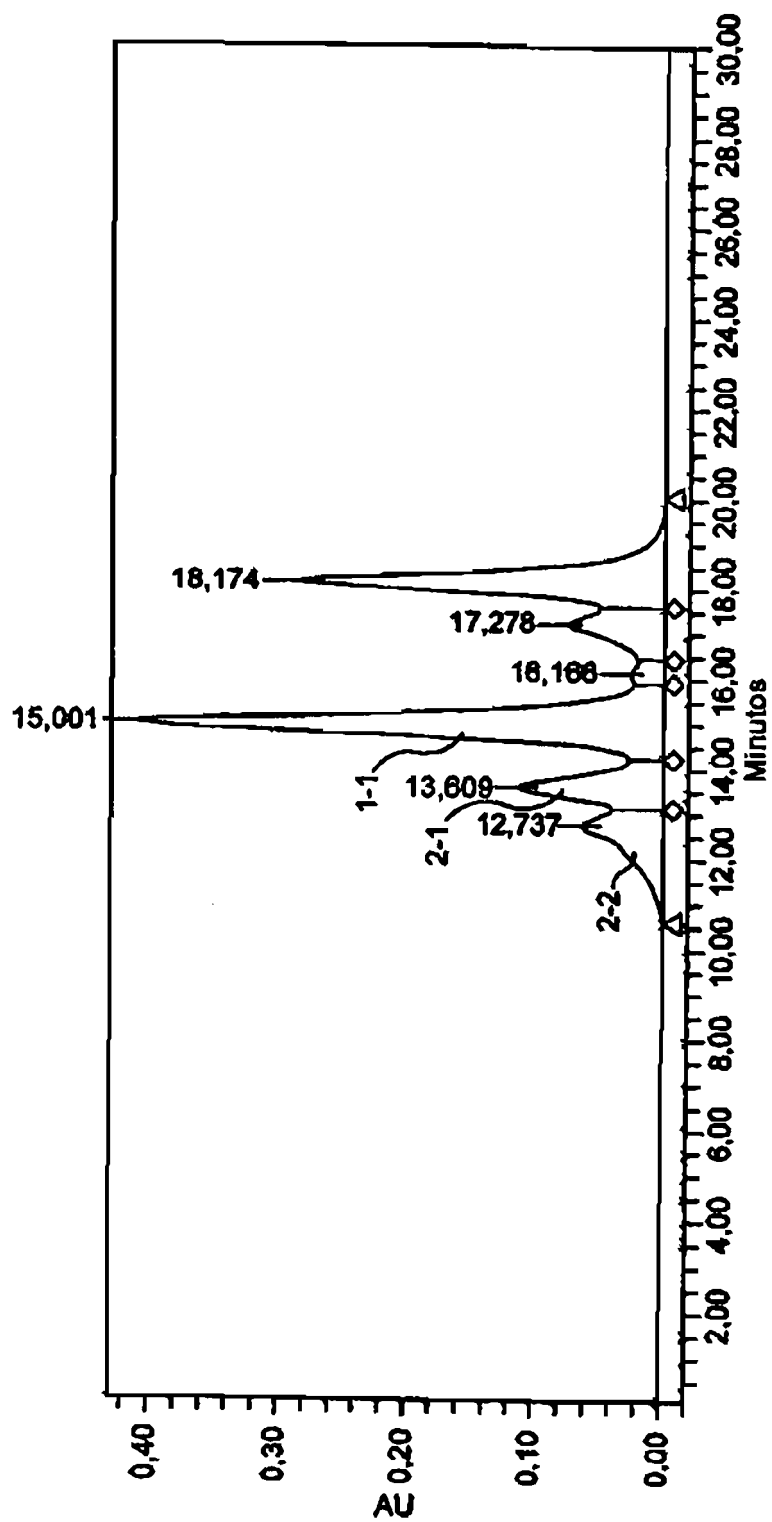


FIG. 2a

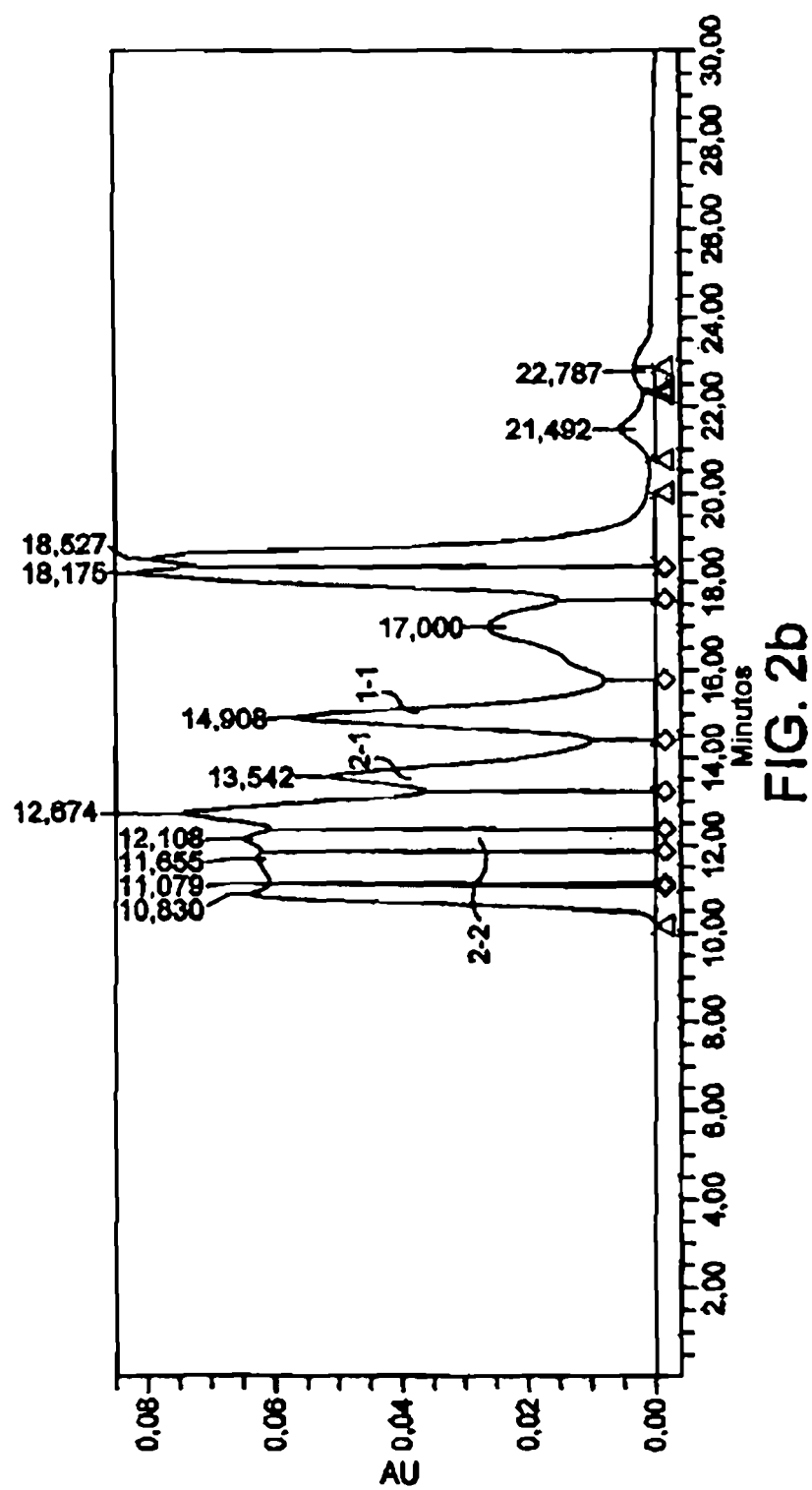


FIG. 2b

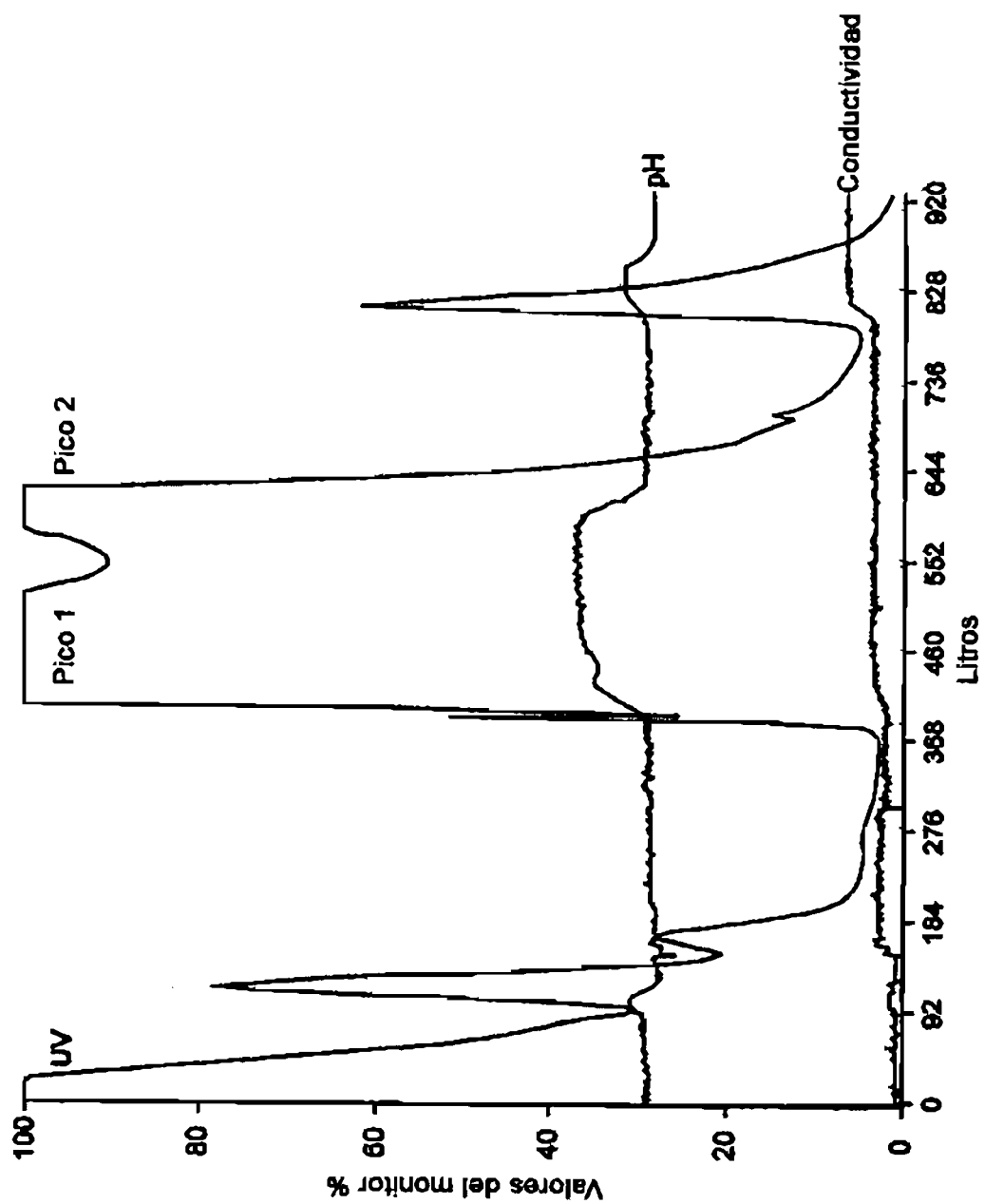


FIG. 3

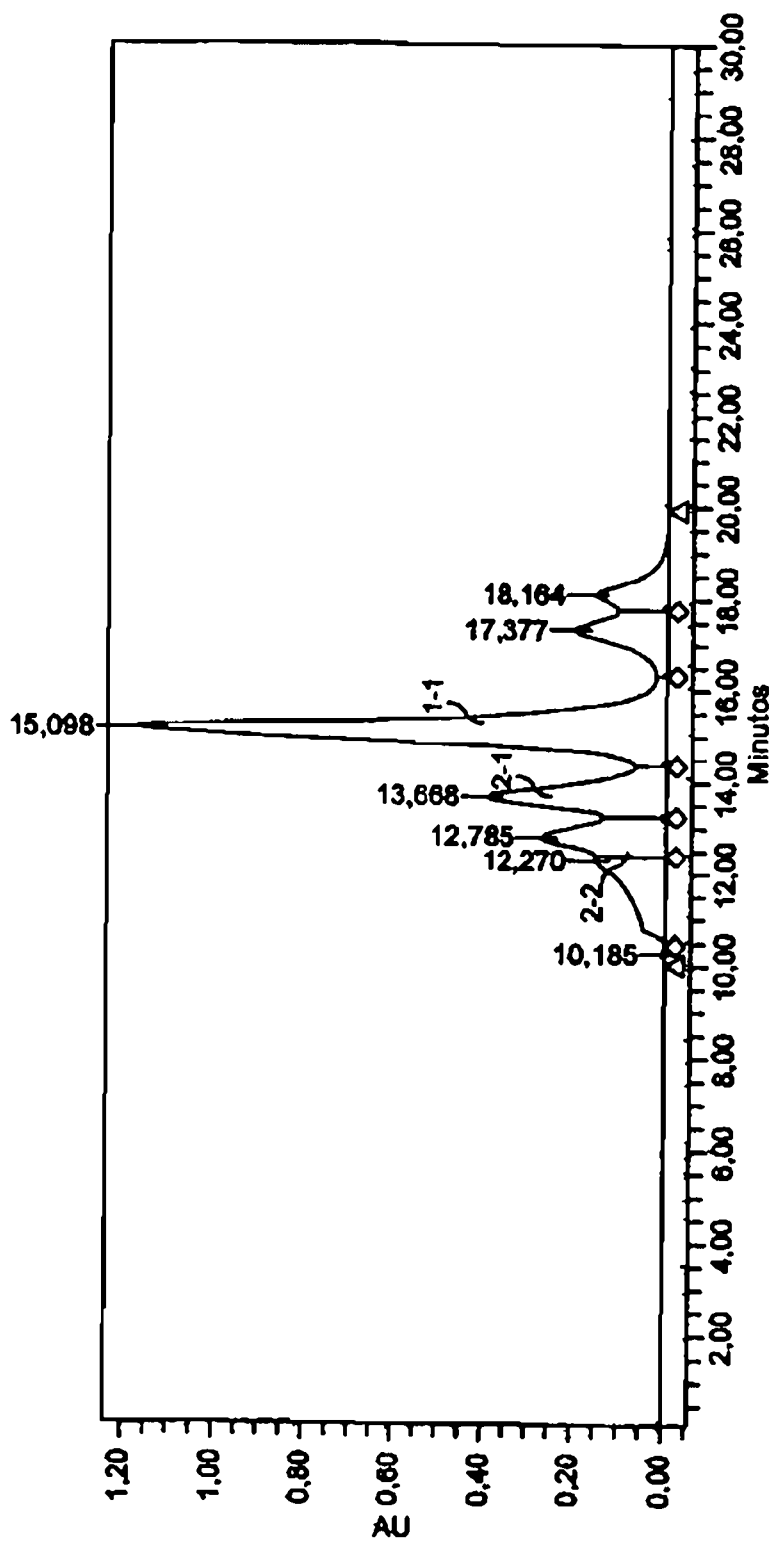


FIG. 4a

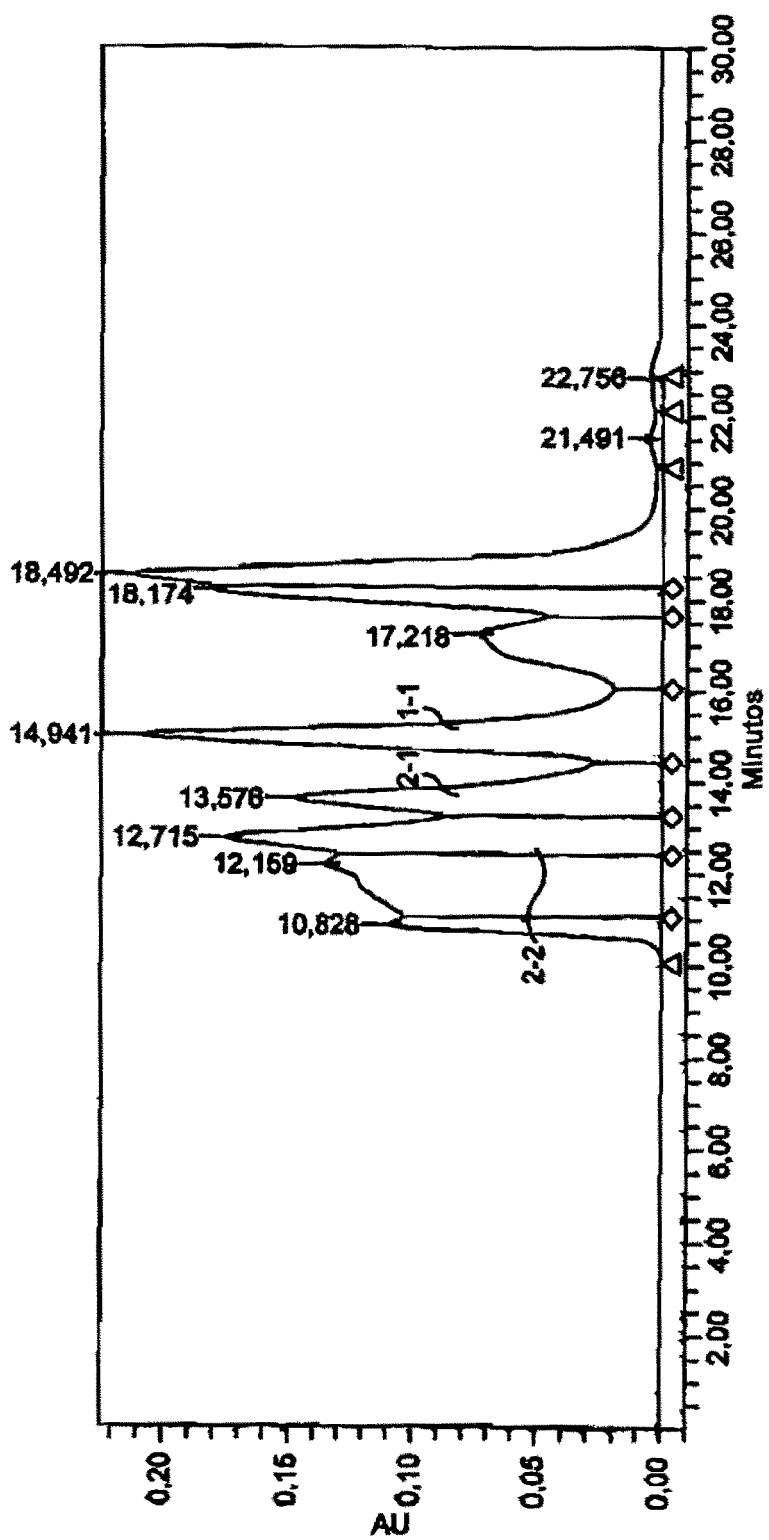


FIG. 4b