

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 775**

51 Int. Cl.:
C12N 1/20

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06253985 .3**

96 Fecha de presentación: **31.07.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1748063**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.01.2007**

54 Título: **Producción y purificación de la proteína A sin emplear componentes de origen animal**

30 Prioridad:
29.07.2005 US 194093

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.10.2012

73 Titular/es:
**AVANTOR PERFORMANCE MATERIALS, INC.
(100.0%)
222 Red School Lane
Phillipsburg NJ 08865, US**

72 Inventor/es:
**LEARY, THOMAS RICHARD y
LAFOE, DANIEL**

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 389 775 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

Producción y purificación de la Proteína A sin emplear componentes de origen animal

Antecedentes de la invención

5 La Proteína A es una proteína de la pared celular producida por *Staphylococcus aureus*. La utilidad de la Proteína A se debe a su capacidad para unirse a la región Fc de la mayoría de las inmunoglobulinas G (IgG) de mamífero y, en menor medida, a las inmunoglobulinas M (IgM) que tienen una región V_{H3}, sin afectar a la afinidad de la inmunoglobulina hacia el antígeno. La Proteína A se usa comercialmente para purificar anticuerpos monoclonales que, a su vez, se emplean frecuentemente como agentes terapéuticos en enfermedades humanas, tales como las enfermedades inflamatorias y el cáncer. Además, la Proteína A se puede utilizar ella misma como agente terapéutico. La Proteína A se puede administrar a un paciente para que se una a los complejos inmunes circulantes en enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide, o para estimular la producción de citocinas específicas en un individuo con una infección. Además, cuando se acopla a una resina cromatográfica, la Proteína A puede actuar como un amortiguador terapéutico para el tratamiento del plasma o de la sangre entera, mediante la eliminación de los complejos de IgG en trastornos tales como la enfermedad autoinmune y el rechazo de trasplantes de órganos.

Originalmente, la Proteína A se obtenía a partir de la pared celular de *S. aureus*, pero se han aislado cepas bacterianas que secretan la proteína y se utilizan también para obtener la Proteína A. Sin embargo, la preparación de la Proteína A por métodos convencionales presenta un problema para su uso en la terapéutica humana. *S. aureus* se cultiva en un medio que contiene productos de origen animal como fuente de aminoácidos para las bacterias. En particular, se utilizan comúnmente hidrolizados y extractos bovinos como suplementos en los medios de crecimiento bacteriano. Por lo tanto, la obtención de la Proteína A partir de medios de cultivo que contienen productos obtenidos a partir de animales puede suponer que productos de origen animal, tales como priones, el agente causante de las vacas locas, la tembladera y la enfermedad degenerativa, pudieran estar presentes en los medios y se transmiten a pacientes humanos. Las preparaciones de Proteína A también se pueden exponer y estar contaminadas con productos de origen animal durante los procesos de purificación posteriores. Por ejemplo, en los métodos utilizados actualmente, la Proteína A se purifica mediante una cromatografía en columna de IgG Sefarosa y la IgG acoplada a la columna cromatográfica de Sefarosa es típicamente de origen animal. Sin embargo, los productos de origen animal que llegan a estar asociados con una preparación de Proteína A durante los procesos de aislamiento y purificación no se purifican fácilmente a partir de la preparación por los métodos conocidos actualmente.

Sumario de la invención

Características esenciales y opcionales de la presente invención se describen en las reivindicaciones principales y en las reivindicaciones subordinadas acompañantes, respectivamente. Por tanto, la presente invención se refiere a un método para producir Proteína A vegetal exenta de contaminación por productos de origen animal, fermentando una cepa de *S. aureus* secretora en un medio específico que contiene aminoácidos o péptidos vegetales en lugar de péptidos de origen animal, recogiendo el medio que contiene la Proteína A y purificando la Proteína A mediante su aplicación a una resina sintética que carece de péptidos de origen animal y filtrando el eluyente procedente de la resina.

En una realización del método, la cepa de *S. aureus* secretora es *Staph aureus*, var *Imre* (*S. Imre*). La Proteína A vegetal se purifica a partir del medio utilizando una resina cromatográfica de intercambio aniónico. La Proteína A vegetal se eluida de la resina cromatográfica se purifica adicionalmente por cromatografía en hidroxapatita para eliminar los contaminantes no proteicos. Después de la purificación, la Proteína A vegetal se puede concentrar y llevarla a un pH fisiológico.

El método de la presente invención hace uso de un medio vegetal para la fermentación de *S. aureus* que consiste en extracto de levadura, aminoácidos y péptidos vegetales, glucosa y sales esenciales. Los péptidos vegetales son péptidos de soja. Por ello, la invención se refiere a métodos para producir una Proteína A vegetal, es decir, una preparación de Proteína A exenta de contaminación con productos de origen animal, haciendo crecer las bacterias en el medio vegetal.

La composición farmacéutica puede contener una Proteína A vegetal producida por el método de la invención y un vehículo adecuado. La composición farmacéutica se puede utilizar en un método terapéutico para el tratamiento de un paciente con necesidad de ello. En particular, la composición farmacéutica se puede utilizar en un método para tratar un paciente que requiera una estimulación de la producción de citocinas o crioglobulinas mediante la administración de la composición farmacéutica de Proteína A vegetal al paciente.

La Proteína A vegetal se puede inmovilizar sobre una resina cromatográfica para formar una Proteína A vegetal-resina cromatográfica. La Proteína A vegetal-resina cromatográfica se puede utilizar en un método para unir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. La Proteína A vegetal-resina cromatográfica se puede utilizar para purificar anticuerpos. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los anticuerpos purificados y un vehículo

adecuado. La composición farmacéutica de los anticuerpos purificados se puede utilizar para tratar un paciente que lo requiera y, en particular, los anticuerpos se utilizan para tratar un paciente que tiene cáncer.

5 Una composición farmacéutica que comprende la Proteína A vegetal-resina cromatográfica y un vehículo adecuado se puede utilizar para el tratamiento de un paciente que lo requiera, en particular, la composición farmacéutica se puede utilizar para tratar la hemofilia adquirida o para tratar enfermedades autoinmunes o problemas relacionados con la inmunidad, o para tratar las enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide o cardiomiopatía dilatada, o para tratar el problema inmune relacionado con la enfermedad de injerto contra hospedador.

10 Por tanto, la invención proporciona un método para producir Proteína A en una forma que evita su contaminación con proteínas de origen animal. Permite ventajosamente el suministro de una preparación de Proteína A y de composiciones farmacéuticas de Proteína A que no hayan estado en contacto con productos de origen animal, asegurando que la Proteína A no está contaminado por ellos. Esto es especialmente importante para el uso de la Proteína A en terapéutica humana.

Breve descripción de los dibujos

15 La Fig. 1 es un gel de SDS-PAGE que ilustra las fracciones obtenidas a partir de Proteína A vegetal eluida a partir de una columna de intercambio aniónico MacroPrep High Q.

La Fig. 2 es un análisis de un perfil lineal de un gel SDS-PAGE de la fracción 6 de la Proteína A vegetal eluida a partir de una columna de intercambio aniónico MacroPrep High Q.

20 La Fig. 3 es una transferencia Western que ilustra la actividad de la Proteína A vegetal purificada por cromatografía de intercambio aniónico MacroPrep High Q, comparada con la de una preparación de Proteína A convencional (Fresenius SpA).

La Fig. 4 es un gel SDS-PAGE que ilustra las fracciones procedentes de la Proteína A vegetal eluida a partir de una columna de hidroxapatita cerámica.

25 La Fig. 5 es un análisis lineal de un gel SDS-PAGE de una transferencia Western que cubre el contenido del perfil de la Proteína A de cada banda de 2 eluciones paralelas de la fracción 3 de la Proteína A vegetal eluida a partir de una columna de hidroxapatita cerámica.

Descripción detallada de la invención

A continuación sigue una descripción de las realizaciones preferidas de la invención. La Proteína A se puede obtener a partir de cualquier cepa productora de Proteína A de *S. aureus*, incluyendo las cepas que son de origen natural, que se han aislado o producido por ingeniería genética. Las cepas productoras de Proteína A de *S. aureus* también pueden incluir las cepas en las que la Proteína A permanece encajada en la pared celular y las cepas que secretan Proteína A en el medio de crecimiento, preferiblemente *S. aureus*, var Imre, por ejemplo. Los métodos con los que se puede recuperar la Proteína A de la pared celular de *S. aureus* (por ejemplo, digestión con enzimas) son bien conocidos por los expertos en la técnica. La Proteína A recuperada de esta forma se puede purificar para eliminar los componentes celulares digeridos. Sin embargo, en la presente invención se obtiene una Proteína A vegetal a partir de cepas de *Staphylococcus* que secretan la Proteína A en el medio, de tal manera que sólo es necesario recoger la Proteína A vegetal desde el medio.

Fermentación y Recogida

40 Las cepas de *S. aureus* se fermentan en un medio condicionado que carece de péptidos de origen animal para evitar la contaminación de la Proteína A con productos de origen animal. Tal y como se menciona en este documento, los "productos de origen animal" se definen como cualquier material transmitido u obtenido a partir de un animal no humano, incluyendo el material péptidos, proteínas, aminoácidos, materiales similares a proteínas, ácidos nucleicos, virus y similares. Tal y como se menciona en esta memoria, la expresión "proteína A vegetal" se define como una composición de Proteína A no contaminada por productos de origen animal o cualquier péptido obtenido a partir de un animal que se obtienen a partir de los medios de fermentación o los medios de purificación. De manera similar, la expresión "medio vegetal" se refiere a medios de fermentación no contaminados por productos de origen animal o cualquier péptido obtenido a partir de animales. Tal y como se usa en esta memoria, la expresión "aminoácidos o péptidos vegetales" se refiere a cualquier péptido, proteína, aminoácido o material semejante a proteínas que no se obtiene a partir de un animal.

50 Las bacterias secretoras se pueden fermentar en cualquier cantidad de medio vegetal que sea suficiente para hacer crecer las bacterias y producir la cantidad deseada de Proteína A. Lo más preferible, *S. aureus* se cultiva en un lote de fabricación a gran escala en tanques fermentadores. Las condiciones de fermentación (es decir, el flujo de aire, la temperatura, la agitación, el pH y la presión) se pueden controlar y/o vigilar electrónicamente, por ejemplo, con un microprocesador o con cualquier otro medio electrónico. Algunas condiciones particularmente preferidas incluyen la fermentación de *S. aureus* a aproximadamente 37°C y un flujo de aire de aproximadamente 1 litro/minuto de aire

estéril por litro de medio. El medio consiste en los componentes de medios condicionados para el crecimiento de *S. aureus*, específicamente, extracto de levadura, glucosa y sales esenciales, y, en el caso de la invención, incluye aminoácidos vegetales y péptidos de soja como fuente de aminoácidos. Los componentes pueden estar en una concentración de aproximadamente 50 gramos/litro (g/l) de extracto de levadura, 15 g/l de péptidos de soja y de 5 a 10 g/l de glucosa disuelta en agua purificada, desionizada con ácido fosfórico diluido e hidróxido de sodio diluido, añadidos según sea necesario durante la fermentación para controlar el pH entre aproximadamente 7 y 8. El medio puede contener además al menos 0,67 mililitros/litro (ml/l) de polietilenglicol para impedir la formación de espuma en la mezcla de fermentación.

En una realización preferida, el caldo de fermentación es inoculado con aproximadamente 5×10^9 *S. aureus* de la cepa *Staph Imre* para la preparación de grandes lotes. Para asegurarse de que la preparación de Proteína A vegetal está totalmente exenta de contaminación por productos de origen animal, la estirpe de *S. aureus* utilizada para inocular el caldo de fermentación, se mantiene también en medio vegetal. *S. aureus* fermenta preferentemente durante 13 a 14 horas a 37°C para obtener una densidad elevada de bacterias con una concentración medida superior a 50, con una longitud de onda de 560 nanómetros (nm) (o mayor que $5,2 \times 10^8$ *S. aureus*/ml), pero se puede fermentar entre 10 a 24 horas para obtener una concentración bacteriana deseada, determinando el tiempo de crecimiento apropiado una persona experta en la técnica. Un examen adicional para confirmar la pureza del cultivo se puede realizar mediante el cultivo de una muestra recogida de forma aséptica del caldo de fermentación, sobre agar Mueller Hinton (que favorece el crecimiento de bacterias Gram negativas) y, sobre metabolitos simples, tales como glutamina, galactosa, melobiosa o similares, identificar un patrón de crecimiento constante o ningún crecimiento, en función del metabolito. Los kits para realizar dicho análisis de identificación y pureza están disponibles comercialmente, por ejemplo, en BioMérieux.

El caldo de fermentación se puede evaluar visualmente con un microscopio para garantizar que el caldo no está contaminado con otros microorganismos. De manera similar, el *S. aureus* en el cultivo se puede examinar utilizando un microscopio para observar si tiene la morfología adecuada que incluye tener: la forma de cocos Gram positivos, pleomorfismo (es decir, colonias individuales, cadenas o rosetas) y un tamaño de aproximadamente 0,6 micras. En el *S. aureus* cultivado también se puede evaluar la calidad y la salud determinando si presenta una morfología redonda, alta, grisácea, en placas de agar sangre, si tiene capacidad de provocar β -hemólisis de la sangre de carnero después de 48 horas y el ensayo positivo para las enzimas coagulasa y catalasa.

La fermentación del caldo en las condiciones deseadas tendrá como resultado preferentemente la producción de Proteína A vegetal con una concentración de 0,68 miligramos/mililitro (mg/ml) de medio. La Proteína A vegetal en el medio de fermentación se puede recoger a continuación haciendo pasar el caldo a través de un sistema de filtración (por ejemplo, el sistema de filtración Prostack de Millipore) utilizando filtros de 0,1 micras. Otros métodos adecuados de filtración también se pueden emplear para eliminar células bacterianas, por ejemplo, cualquier método de filtración en profundidad con medios auxiliares, tales como tierra de diatomeas. Las células de *Staphylococcus* también se pueden eliminar mediante centrifugación continua a velocidad elevada del medio de fermentación de *S. aureus*, la centrifugación con sedimentación de las células bacterianas y el enriquecimiento del medio con la Proteína A vegetal secretada. El caldo exento de células se puede hacer pasar después a través de un filtro estéril de 0,22 micras o similar, antes de una purificación adicional.

Purificación

La Proteína A vegetal pasa por varias etapas de procesamiento posterior para obtener una preparación de Proteína A vegetal purificada. Así, los métodos de la invención también incluyen la purificación de la Proteína A vegetal. El medio que contiene la Proteína A vegetal se somete a diafiltración para disminuir la conductividad de la solución y eliminar el material no proteico, que coexiste con la Proteína A vegetal. La conductividad de la solución de Proteína A vegetal se reduce de modo que no sea superior a 2 milisiemens/centímetro (mS/cm). La diafiltración de la solución se puede realizar utilizando un filtro y el tampón deseado y, en una realización de la invención, se hace usando una membrana de peso molecular límite 10.000 (MWCO) en tampón Tris HCl 10 milimolar (mM) a pH 7,8. Los métodos de diafiltración se conocen en la técnica y pueden incluir membranas MWCO (por ejemplo, PROCON de Millipore), un filtro para diálisis de fibra hueca (por ejemplo, OPTIFLUX de Fresenius) o cualquier otro sistema de filtración con un peso molecular límite apropiado para lograr el rendimiento máximo y/o deseado en Proteína A vegetal.

El medio que contiene Proteína A vegetal se purifica usando un método cromatográfico en el que los materiales cromatográficos están exentos de productos de origen animal. La Proteína A vegetal se purifica mediante la aplicación de la solución que contiene la Proteína A vegetal sobre una resina para cromatografía de intercambio aniónico. Se puede emplear una variedad de resinas de intercambio aniónico y las matrices adecuadas incluyen celulosa, acrilamida y gel de sílice. Muchos sistemas cromatográficos de intercambio aniónico están disponibles comercialmente y, en la realización más preferida de la invención, la solución que contiene Proteína A vegetal se purifica utilizando la resina de intercambio aniónico MacroPrep High Q. La Proteína A vegetal se puede aplicar a la matriz cromatográfica de intercambio aniónico a través de métodos bien conocidos en la técnica. Típicamente, la columna cromatográfica se equilibra al pH y conductividad de la solución que contiene la Proteína A vegetal (es decir, pH 7,5 a 8,5) y el medio que contiene la Proteína A vegetal se pasa por la columna que fija la Proteína A vegetal debido a interacciones intermoleculares. En una realización, la Proteína A vegetal unida a la columna se lava

con tampón de equilibrio y se puede lavar con cualquier tampón con un pH y una conductividad adecuados. La cromatografía se realiza preferiblemente con un caudal de aproximadamente 5,7 a 7,9 cm/minuto, sobre una columna que tiene una altura de aproximadamente 24 centímetros. La Proteína A vegetal se puede eluir después desde la columna usando el tampón con carga adecuada y, en una realización particular de la invención, utilizando

- 5 Tris HCl 20 mM y cloruro de sodio (NaCl) que tiene una conductividad de aproximadamente 8 mS/cm. En una realización de la invención, la cromatografía de intercambio aniónico del medio de la Proteína A vegetal produce un eluyente de Proteína A vegetal que contiene una Proteína A vegetal con una pureza de al menos 95%. En una realización preferida, el eluyente de Proteína A vegetal contiene Proteína A vegetal con una pureza superior al 95% y lo más preferible, con una pureza del 97 al 99%.
- 10 En otra realización de la invención, el eluyente de la Proteína A vegetal procedente de la columna de cromatografía de intercambio aniónico, se diafiltra para ajustar el pH y la conductividad de la solución. La diafiltración se realiza lo más preferiblemente usando una membrana de 10.000 MWCO para producir un material filtrado de Proteína A vegetal que tiene un pH de aproximadamente 6,5 a 7,1 y una conductividad de aproximadamente 1 a 2 mS/cm.

El material filtrado de la Proteína A vegetal se purifica adicionalmente a continuación por cromatografía en hidroxapatita para eliminar los contaminantes no proteicos. La hidroxapatita es una resina cromatográfica de intercambio iónico de modo mixto que provoca que las proteínas (por ejemplo, la Proteína A vegetal) eluyan primero y los compuestos que contienen carbohidratos eluyan con posterioridad a las proteínas. Se prefiere que la resina de hidroxapatita tenga una altura de lecho de resina de aproximadamente 20 cm en una columna cromatográfica. Una vez que se aplica el material filtrado de la Proteína A vegetal a la resina de hidroxapatita, se lava con un tampón y,

- 15 en una realización de la invención, el tampón es fosfato sódico 14 mM a pH 6,8. En una realización preferida, la Proteína A vegetal se eluye a continuación desde la columna de hidroxapatita utilizando fosfato sódico 370 mM a pH 6,8.

Después de la purificación, la Proteína A vegetal se puede concentrar hasta un volumen y/o concentración deseados, adecuados para su almacenamiento o uso. Los mecanismos para concentrar proteínas son bien conocidos en la técnica y típicamente implican filtros o centrifugación. En una realización de la invención, la solución de Proteína A vegetal se concentra después de la cromatografía de intercambio aniónico, mientras que en otra realización, la solución de Proteína A vegetal se concentra después de la cromatografía en hidroxapatita. El eluyente de Proteína A vegetal se puede concentrar utilizando un filtro de 10.000 MWCO para lograr una preparación de 5 a 20 mg/ml de Proteína A vegetal, en una realización preferida de la invención. Con el fin de utilizar la Proteína A vegetal en aplicaciones en las que se requiere un pH fisiológico, el pH de la Proteína A vegetal concentrada se puede ajustar a pH neutro, preferiblemente utilizando tampón fosfato.

- 25
- 30

Composiciones y métodos de tratamiento

La Proteína A vegetal se puede administrar directamente a los pacientes o, más preferiblemente, en combinación con un vehículo adecuado. Por lo tanto, una composición farmacéutica puede comprender la Proteína A vegetal y un

- 35

A un paciente que lo requiera se puede administrar una composición farmacéutica de Proteína A vegetal, por ejemplo, con el fin de estimular la producción de citocinas o crioglobulinas. Más preferiblemente, el paciente es tratado de esta manera para combatir una infección o mejorar un sistema inmune amenazado. La composición farmacéutica de Proteína A vegetal se administra según sea apropiado, tal y como lo determina un experto en la técnica, pero un método más adecuado de administración es por inyección en el torrente sanguíneo del paciente.

- 40

La Proteína A vegetal se puede inmovilizar sobre una resina cromatográfica. La resina sobre la que se inmoviliza la Proteína A vegetal puede ser tan pequeña como 40 micras o tan grande como 300 micras. En una realización de la invención, la resina es un polímero sintético (por ejemplo, polimetacrilato), un polímero semisintético (por ejemplo, poligalactosa) o un material amorfo (por ejemplo, tierra de diatomeas o sílice). En una realización adicional de la invención, la resina de Proteína A vegetal se puede producir mediante la reacción de un grupo carboxilo o amino en la Proteína A vegetal, con un grupo químicamente funcional en la resina cromatográfica. En una realización preferida de la invención, los grupos carboxilo de la Proteína A vegetal se hacen reaccionar con grupos amino en la resina para producir la resina-Proteína A vegetal. En otra realización, la resina se puede activar con triazina y la Proteína A vegetal reacciona con la triazina unida a la resina. En todavía otra realización, se pueden conseguir títulos muy altos de la unión de la Proteína A vegetal con medios de aldehído activados o con medios de carbohidrato, oxidando en primer lugar la resina con peryodato de sodio, seguido de una reducción de la Proteína A vegetal sobre el medio, utilizando ascorbato o borohidrato sódico. En la realización más preferida, la Proteína A vegetal se fija a la resina en distintos lugares de la proteína para minimizar la lixiviación de la Proteína A desde la resina.

- 45
- 50

Anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se pueden unir a la Proteína A vegetal-resina. Los términos "anticuerpo" y "fragmentos de anticuerpo" abarcan tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales. Además, el término anticuerpo tal y como se usa en esta memoria, abarca también varios tipos de anticuerpos, que incluyen los humanos, quiméricos, humanizados, primatizados, revestidos o de cadena sencilla. Los anticuerpos o fragmentos de

- 55

anticuerpos se pueden unir a una Proteína A vegetal-resina mediante la aplicación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos a la Proteína A vegetal-resina por métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se unen típicamente a la resina mediante la aplicación de una solución de anticuerpo a la resina, con condiciones tales que los anticuerpos se unen a la resina, y el lavado de la resina unida al anticuerpo con el tampón apropiado para eliminar el material no unido. En una realización, los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos se unen a la Proteína A vegetal-resina con el fin de purificar los anticuerpos.

Una composición farmacéutica puede comprender anticuerpos o fragmentos de anticuerpos purificados utilizando la Proteína A vegetal-resina y un vehículo adecuado (por ejemplo, perlas de sílice de Dohkai MicroSphere). Los anticuerpos se pueden purificar por métodos bien conocidos por un experto en la técnica. De hecho, la purificación de los anticuerpos utilizando una Proteína A-resina cromatográfica es uno de los métodos utilizados más comúnmente para ello y los métodos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow, E. y Lane, D.P., *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York (1988)). Un paciente que lo requiera se puede tratar con una composición farmacéutica de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos purificados en un vehículo adecuado. Existen muchas enfermedades en las que los anticuerpos purificados se pueden utilizar como tratamiento, incluyendo la enfermedad inflamatoria (por ejemplo, enfermedad de Crohn, enfermedad de Behcet y colitis), enfermedad reumática, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, lupus, cáncer, trastornos de la piel y alergia. En una realización particular, al paciente se le trata un cáncer.

Una composición farmacéutica que comprende la Proteína A vegetal-resina y un vehículo adecuado se puede utilizar para tratar un paciente que lo requiera mediante la administración de una composición farmacéutica de Proteína A vegetal-resina. En una realización del método, al paciente se le trata la hemofilia adquirida. En otra realización, al paciente se le trata una enfermedad autoinmune o problemas relacionados con la inmunidad. En una realización adicional, la enfermedad autoinmune es la artritis reumatoide o cardiomiopatía dilatada. En aún otra realización, el problema relacionado con la inmunidad es la enfermedad del injerto contra hospedador o el rechazo de órganos trasplantados.

25 Vehículos adecuados y modos de administración

De acuerdo con los métodos, las composiciones farmacéuticas de Proteína A vegetal o los anticuerpos purificados o los fragmentos de anticuerpos se pueden administrar a un paciente por una vía adecuada, ya sea solos o en combinación con otro fármaco. Una cantidad eficaz de una composición farmacéutica (por ejemplo, Proteína A vegetal, Proteína A vegetal inmovilizada sobre una resina cromatográfica o anticuerpos purificados utilizando una Proteína A vegetal-resina) se administra a un paciente. Una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para conseguir el efecto terapéutico o profiláctico deseado, bajo las condiciones de administración, tales como una cantidad suficiente para estimular las células inmunes o unirse a proteínas relacionados con la enfermedad. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en una sola dosis o en dosis múltiples para asegurarse de que el paciente mantenga niveles plasmáticos elevados de las composiciones farmacéuticas de Proteína A vegetal o de anticuerpos purificados mediante la Proteína A vegetal, durante la terapia. La dosificación se puede determinar por métodos conocidos en la técnica y depende, por ejemplo, del agente particular elegido, de la edad del paciente, del peso corporal, de la sensibilidad y la tolerancia a los fármacos, y del bienestar general. Las dosificaciones adecuadas para composiciones farmacéuticas que comprenden Proteína A vegetal, pueden ser desde aproximadamente 0,001 miligramos/kilogramo (mg/kg) hasta aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por tratamiento, y para los anticuerpos purificados empleando Proteína A vegetal, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 100/kg de peso corporal por tratamiento.

Son posibles una variedad de vías de administración, incluyendo, por ejemplo, las vías de administración oral, alimenticia, tópica, transdérmica, rectal, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intramuscular, inyección subcutánea, inyección intradérmica) e inhalación (por ejemplo, intrabronquial, intranasal o inhalación oral, gotas intranasales), dependiendo del agente y la enfermedad o el estado que se va a tratar. La administración puede ser local o sistémica, tal y como se indica. El modo preferido de administración puede variar dependiendo del agente particular elegido, y la enfermedad particular que está siendo tratada; sin embargo, se prefiere generalmente la administración oral o parenteral.

Las formulaciones de composiciones farmacéuticas de Proteína A vegetal y de anticuerpos purificados variarán según la vía de administración seleccionada (por ejemplo, solución, emulsión o cápsula). Los vehículos farmacéuticos adecuados pueden contener ingredientes inertes que no interaccionan con las composiciones farmacéuticas de Proteína A vegetal o con los anticuerpos purificados con Proteína A vegetal. Se pueden emplear técnicas convencionales de formulación farmacéutica, tales como las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Los vehículos farmacéuticos adecuados para la administración parenteral incluyen, por ejemplo, agua estéril, solución salina fisiológica, solución salina bacteriostática (solución salina que contiene aproximadamente 0,9% mg/ml de alcohol bencílico), solución salina tamponada con fosfato, solución de Hank, lactato de Ringer y similares. Los métodos de composiciones para encapsulación (tal como en un recubrimiento de gelatina dura o ciclodextrano) son conocidos en la técnica. Para inhalación, el agente puede estar solubilizado y se carga en un dispensador adecuado para la administración (por ejemplo, un atomizador o un nebulizador o un aerosol presurizado).

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración de la invención y no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

Ejemplificación

Ejemplo 1 (Referencia)

- 5 Los componentes del caldo de fermentación en el que se cultivó *S. aureus* para producir la Proteína A vegetal tenían aproximadamente una concentración de 50 gramos/litro de extracto de levadura, 15 gramos/litro de péptidos de soja y de 5 a 10 gramos/litro de glucosa. En particular, para la preparación de una fermentación por lotes, los medios vegetales contenían los materiales con las concentraciones identificadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Materiales para el caldo de fermentación

Descripción	Cantidad requerida
Soytona	6,75 ± 0,2 kg
Cloruro sódico	1,875 ± 0,2 kg
Glucosa	0,938 ± 0,1 kg
Fosfato de potasio monobásico	0,938 ± 0,1 kg
Extracto de levadura	18,75 ± 0,4 kg
Polietilenglicol P-2000 anti-espuma	250 ± 5 ml
<i>Staphylococcus aureus</i> , var. Imre "vegan working seed"	1 frasco (5x10 ⁹)
Ácido fosfórico, N.F. <i>sin diluir</i>	según sea necesario para mantener el pH de 7 a 8
Hidróxido de sodio, 50%, <i>sin diluir</i>	según sea necesario para mantener el pH de 7 a 8

10

Ejemplo 2 (Referencia)

Las condiciones para la fermentación de *S. aureus* productora de Proteína A vegetal en la preparación de fermentación por lotes se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros del fermentador

Sistema de control	Temperatura	Flujo de aire	Presión	Agitación	pH
Requisitos	37 ± 1°C	325 ± 25 sLpm	4,188 ± 0,0698 bar	400 ± 25 rpm	8,0 ± 0,5

15

Ejemplo 3 (Referencia)

Ensayo de la actividad de la Proteína A vegetal

- La actividad y el rendimiento de la Proteína A en cada etapa se determinó mediante un ensayo simple. Una columna pequeña de IgG-Sefarosa fue verificada para estudiar su actividad de unión y la capacidad de unión utilizando Proteína A producida por métodos convencionales. Se aplicó una muestra que contiene una cantidad subsaturante de Proteína A, la columna se lavó, la Proteína A eluyó con tampón glicina pH 2,2 y la concentración de Proteína A se determinó por DO₂₇₅. Este ensayo se usó para determinar desde el principio hasta el fin la actividad y el rendimiento de la Proteína A vegetal. Alternativamente, todos los extractos crudos, se pueden cuantificar más convenientemente usando HPLC y cromatografía de fase inversa, intercambio iónico o de exclusión por tamaño de la columna.

- 25 Cromatografía de intercambio aniónico con MacroPrep High Q

- Después de evaluar una variedad de resinas cromatográficas disponibles comercialmente (Mallinckrodt, EMD, BioRad, Millipore), se seleccionó la resina cromatográfica de intercambio aniónico de BioRad MacroPrep High Q(quarterary). El caldo diafiltrado se aplicó a una columna pequeña de 67 ml utilizando un sistema de cromatografía de Pharmacia Biotech BioPilot automático, usando el programa Unicorn para la operación de configuración (columna de 1,5 cm x 38 cm; 12 mL/min) y la recogida de datos. Después de aplicar el caldo diafiltrado, la columna se lavó con 6 volúmenes de columna de Tris HCl 10 mM, pH 7,8. La Proteína A vegetal activa eluyó utilizando 6 volúmenes de columna con Tris HCl 20 mM, pH 7,8 + NaCl hasta 8 mS/cm (gradiente de etapa). La columna se lavó posteriormente con Tris HCl 20 mM pH 7,8 + NaCl 0,5 M para eliminar el material marrón que se adhería a la mitad superior de la columna. Periódicamente, la columna se puede limpiar totalmente mediante el uso de varios volúmenes de columna de NaOH 0,1 M seguido de lavado con varios volúmenes de columna de Tris HCl 0,2 M pH 7,8 para ajustar el pH y Tris HCl 10 mM para ajustar la conductividad.

- Aproximadamente 0,5 gramos (g) de proteína en 150 ml de caldo diafiltrado/concentrado se aplicaron a una columna de 67 ml que contenía 106 mg de Proteína A vegetal. En las fracciones seleccionadas (corte), se recuperaron 58 mg de Proteína A vegetal (55%). Aproximadamente 28 mg de Proteína A vegetal estaban contenidos en otras fracciones disponibles (26%). Aunque sólo se exploró extensamente el primer corte, el SDS-PAGE sugirió que las fracciones

40

posteriores también podrían ser adecuadas. Si es posible un corte de la elución total, la recuperación sería entonces del 81% para la etapa de cromatografía de intercambio aniónico.

La Fig. 1 muestra el SDS-PAGE realizado en un caldo exento de células, un caldo diafiltrado, el flujo a través de MacroPrep Q, y diversas fracciones obtenidas a partir de la ejecución de la cromatografía con MacroPrep High Q. No se trató de ajustar las cantidades de carga, por lo que varios carriles estaban sobrecargados con una o más bandas. A pesar de la saturación de varias bandas, todavía se pueden hacer algunas observaciones interesantes. El análisis del perfil sugería que la Proteína A vegetal podría ser responsable de hasta un 20% de la proteína presente en el caldo. (No se trató de determinar la cantidad de lípidos o hidratos de carbono presentes, a pesar de que había pruebas químicas indirecta de ambos). En segundo lugar, algunas de las proteínas evidentes en el caldo no se unían a la MacroPrep Q y pasaban a través de la columna (véase el flujo a través de la columna).

Las fracciones 5 a 11 se diluyeron y se aplicaron a un gel de SDS-PAGE Novex con gradiente de 4 a 12%. Estudios previos han mostrado una respuesta lineal desde 0,05 microgramos (μg) a 2,0 μg de muestra, utilizando este sistema. Se observan varias bandas menores debajo de la banda principal. Esto es típico de la Proteína A y representa isoformas que en otros estudios se ha mostrado que están presentes en los productos de la fermentación. La presencia de las isoformas no es debida a la degradación que ocurre en el proceso de purificación posterior, sino que es debida probablemente a la degradación durante el proceso de fermentación, ya que es bien sabido que *S. aureus* secreta proteasas. En la Fig. 2 se presenta un examen de bandas (más preciso) en oposición a un examen de líneas de la Fracción 6. El pico principal representa el 90,2% de la proteína con isoformas que representan un 8,4% adicional. La fracción 7 (no se muestra el perfil) tenía un pico principal de 96,5% e isoformas de 1,9%. La fracción 8 (no se muestra el perfil) tenía un pico principal de 97,4% e isoformas de 1,0%.

La evidencia de que las bandas designadas como isoformas tenían Proteína A se determinó por el rendimiento de una transferencia Western para la actividad de la Proteína A que se presenta en la Fig. 3. Un centenar de nanogramos (ng) y 10 ng de una muestra colectiva de Proteína A vegetal por duplicado preparada con MacroPrep Q, se estudiaron en un gel de Novex de SDS-PAGE del 4 al 12%. Se incluyeron patrones de peso molecular teñidos previamente en el gel. Cuando la electroforesis en gel se completó, las muestras de proteína se transfirieron electroforéticamente (60V/300 mAmp/1h) a una membrana de 0,2 micras de nitrocelulosa (BioRad) en tampón de transferencia Towbin. La membrana transferida se lavó con solución salina tamponada con Tris-HCl y luego se bloqueó durante 1 hora con SuperBlock. Después de un lavado con 0,05% de Tween-20 en solución salina tamponada con Tris HCl (TTBS), la membrana se incubó con un conjugado de IgG de conejo anti-ratón-fosfatasa alcalina durante 30 minutos. Después de dos lavados de 5 minutos en TTBS, la membrana se sumergió en colorante Vector Black de Vector Labs (kit del sustrato BCIP/NBT, fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/nitroazul de tetrazolio). El subproducto de las reacciones de los sustratos con fosfatasa alcalina, forma un precipitado negro en la membrana cuando de la reacción química avanza y la posición de la fosfatasa alcalina se puede identificar. Puesto que la fosfatasa alcalina se conjugó con la IgG de conejo, su posición identificaba la posición de la actividad de la Proteína A sobre la membrana.

No sólo se tiñó con facilidad la banda principal de la Proteína A vegetal A y la Proteína A preparada por métodos convencionales (véase, Fresenius SpA, Fig. 3) con esta técnica, varias bandas de menor importancia eran visibles justo debajo de la banda principal. Además, la banda principal de la Proteína A vegetal migraba entre 50.000 kilodalton (KD) y los marcadores de peso molecular de 38.000 KD. La Proteína A preparada por métodos convencionales tiene un peso molecular de 47.000 KD según lo determinado por la espectrometría de masas de tipo MALDI TOF. Así, la transferencia Western confirmó que la Proteína A vegetal tenía el tamaño esperado.

Ejemplo 4 (la invención)

Hidroxiapatita cerámica de tipo 1

Fracciones agrupadas de MacroPrep Q se diafiltraron hasta tener menos de 2 mS/cm con fosfato sódico (Na fosfato) 14 mM a pH 6,8. La muestra se aplicó a una columna cromatográfica de 8 ml de hidroxiapatita cerámica de BioRad, equilibrada con fosfato de Na 14 mM. Un pico reducido apareció durante el flujo a través. (El BioPilot utiliza un filtro de banda ancha UV de aproximadamente 260 a 290 nanómetros). Puesto que el pico era reducido, probable representaba un artefacto arrastrado por el tampón o alguna otra condición del tampón, a pesar de que podría representar un material real. La columna se lavó luego con 5 volúmenes de columna de fosfato de Na 14 mM pH 6,8 (1,7 mS/cm). A continuación, la Proteína A vegetal eluyó con 5 volúmenes de columna de fosfato de Na 370 mM pH 6,8 (25 mS/cm).

En primer lugar, la columna se cargó con 26 mg de Proteína A vegetal, tal y como se determinó por el ensayo de actividad, y se recuperaron 27 mg de Proteína A vegetal activa, es decir, hubo una recuperación completa dentro del error del ensayo. Las muestras del pico principal circularon sin diluir o diluidas, según fuera apropiado para la carga adecuada, en un SDS-PAGE de NOVEX del 4 a 12% (ver Fig. 4). Una vez más había una banda principal con varias bandas menores justo debajo de la banda principal de la Proteína A vegetal. Una banda menor también era visible cerca de la parte inferior del gel cerca de la parte delantera de la tinción.

5 Una muestra de la Fracción 2 fue sometida a ensayo en busca de actividad de la Proteína A mediante transferencia Western. La banda principal y las isoformas eran claramente visibles, tal y como se observa en la Fig. 3. No se observó ninguna otra actividad de la Proteína A en la transferencia Western. En la Fig. 5, se realizó un análisis del perfil en cada una de las bandas de la Fracción 3, en SDS-PAGE. La banda principal de cada perfil representaba el 94,9% y 94,6% de proteína presente. Las isoformas representaban el 2,8% y 2,6%, respectivamente. Por tanto, la Proteína A vegetal representaba aproximadamente el 97% al 98% de proteína presente.

Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente haciendo referencia a realizaciones preferidas de la misma, los expertos en la técnica comprenderán que se pueden realizar en la misma diversos cambios en la forma y los detalles sin apartarse del alcance de la invención abarcada por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir Proteína A vegetal, que es una proteína exenta de contaminación por productos de origen animal y que tiene una actividad de Proteína A vegetal, comprendiendo el método:
- 5 fermentar una cepa secretora de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) en un medio que contiene extracto de levadura, aminoácidos, péptidos de soja, glucosa y sales esenciales, estando dicho medio exento de productos animales, para producir un medio que contiene Proteína A vegetal;
- recoger el medio que contiene la Proteína A vegetal; y
- purificar la Proteína A vegetal a través de las siguientes etapas:
- 10 i) aplicar el medio que contiene la Proteína A vegetal a una columna de resina y eluir la Proteína A vegetal desde la columna de resina, en donde dicha resina sintética es una resina para cromatografía de intercambio aniónico,
- ii) diafiltrar el eluyente de Proteína A vegetal de la columna cromatográfica de intercambio aniónico para reducir la conductividad de la solución a un máximo de 2 mS/cm, seguido de
- iii) poner en contacto con una columna cromatográfica con hidroxiapatita cerámica y eluir la Proteína A vegetal desde la columna.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:
- (a) el *S. aureus* es la cepa secretora Staph Imre; y/o
- (b) la estirpe de *S. aureus* utilizada para inocular el fermentador se mantiene en un medio vegetal; y/o
- (c) los *S. aureus* se fermentan durante 10 a 24 horas; y en tal caso, opcionalmente, *S. aureus* se fermentan durante 13 a 14 horas; y/o
- 20 (d) el pH del medio que contiene la Proteína A vegetal se ajusta a aproximadamente 7,5 hasta 8,5 y la conductividad se ajusta a menos de 2 milisiemens/centímetro por diafiltración utilizando hidroximetil amino metano 10 milimolar y NaCl; y/o
- (e) la cromatografía se realiza con un caudal lineal de 5,7 a 7,9 centímetros/minuto en una columna de 24 centímetros de altura.
- 25 3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la Proteína A vegetal eluye como un eluyente de Proteína A vegetal a partir de la columna cromatográfica de intercambio aniónico en la etapa i) utilizando al menos Tris HCl 20 milimolar y NaCl con una conductividad de 8 milisiemens/centímetro.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3:
- 30 (a) en donde el pH del eluyente de Proteína A vegetal se ajusta a pH 6,5 a 7,1 en la etapa (ii) mediante diafiltración con fosfato sódico 14 milimolar a pH 6,8; y/o
- (b) el eluyente de Proteína A vegetal se diafiltra utilizando una membrana que tiene un peso molecular límite de 10.000 para formar un eluyente de Proteína A vegetal; y/o
- (c) que comprende además la concentración del eluyente de Proteína A vegetal hasta aproximadamente 5 a 20 miligramos/mililitro utilizando un filtro para peso molecular de 10.000 y ajustar el eluyente de Proteína A vegetal a un pH neutro; y/o
- 35 (d) en donde el pH del eluyente de Proteína A vegetal se ajusta a pH neutro usando un tampón de fosfato; y/o
- (e) en donde el filtrado de Proteína A vegetal aplicado a la columna de cromatografía con hidroxiapatita se lava con fosfato de sodio 14 milimolar a pH 6,8 y se eluye con fosfato sódico 370 mM a pH 6,8; y en tal caso además opcionalmente, la altura del lecho de resina en la columna cromatográfica de hidroxiapatita es de 20 centímetros; y/o
- 40 (f) que comprende además la concentración del eluyente de Proteína A vegetal eluido desde la columna cromatográfica de hidroxiapatita hasta 5 a 20 miligramos/mililitro, utilizando un filtro para un peso molecular de 10.000 y ajustar el eluyente de Proteína A vegetal a un pH neutro; y/o
- 45 (g) el pH del eluyente de Proteína A vegetal se ajusta a pH neutro utilizando un tampón fosfato.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el medio de fermentación comprende péptidos de soja con una concentración de 15 gramos por litro, una concentración de extracto de levadura de 50 gramos por litro y una concentración de glucosa de 5 a 10 gramos por litro.

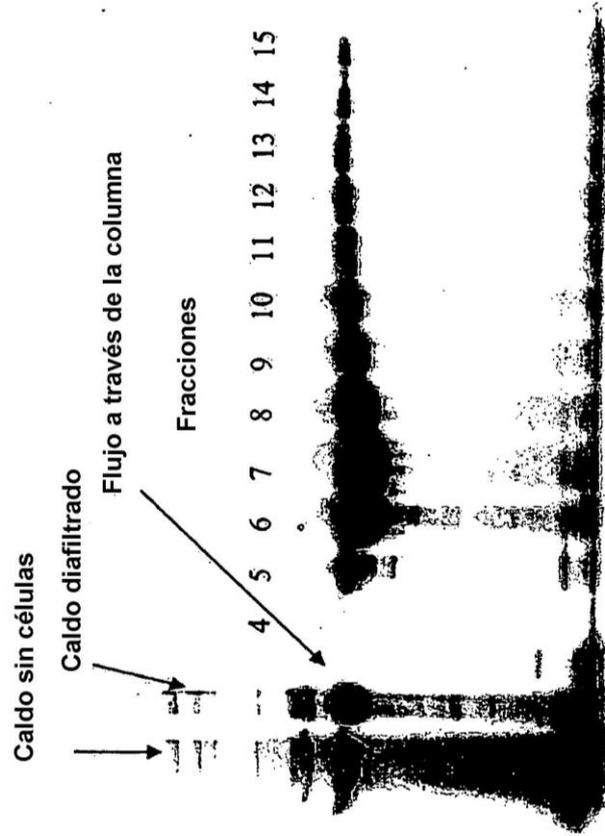


Figura 1

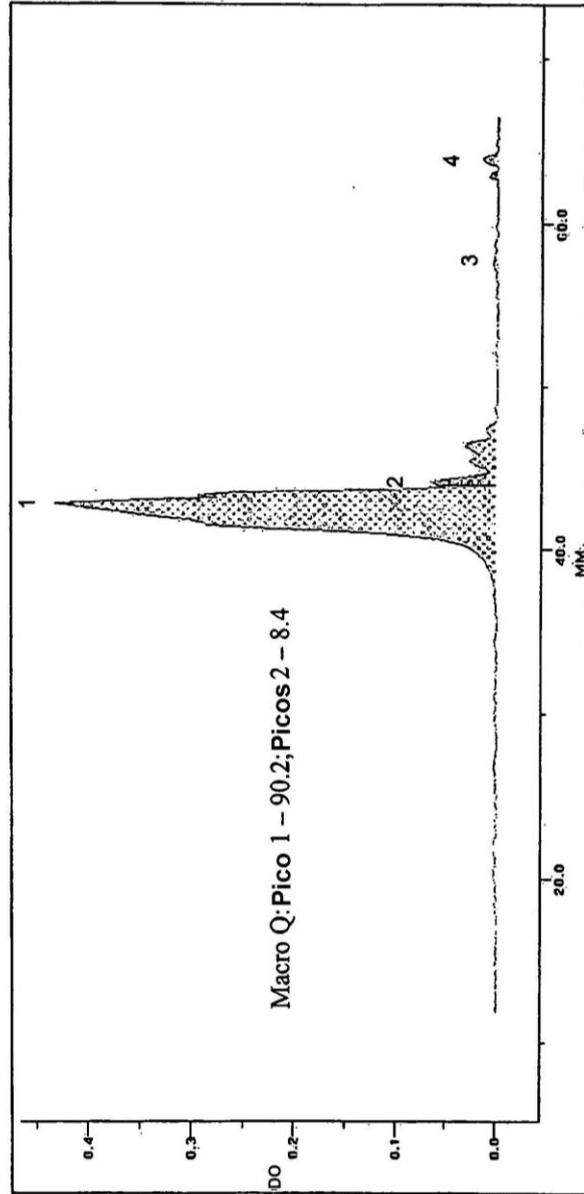


Figura 2

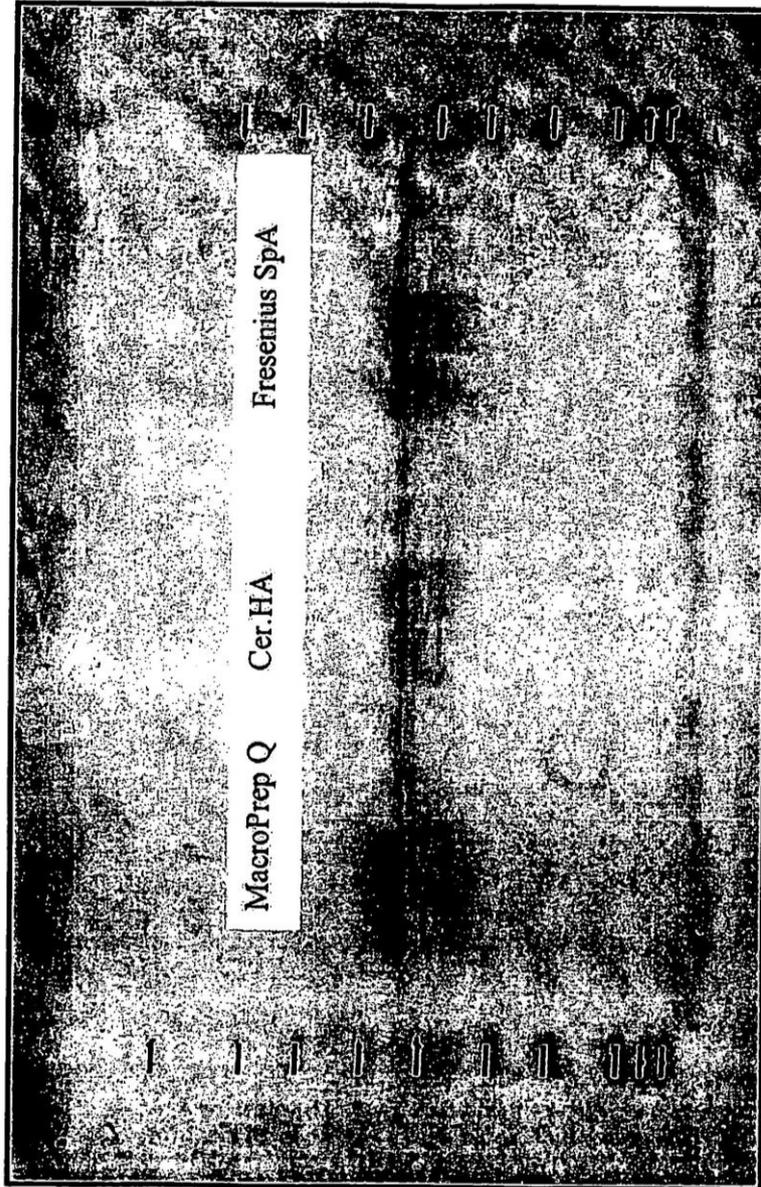


Figura 3

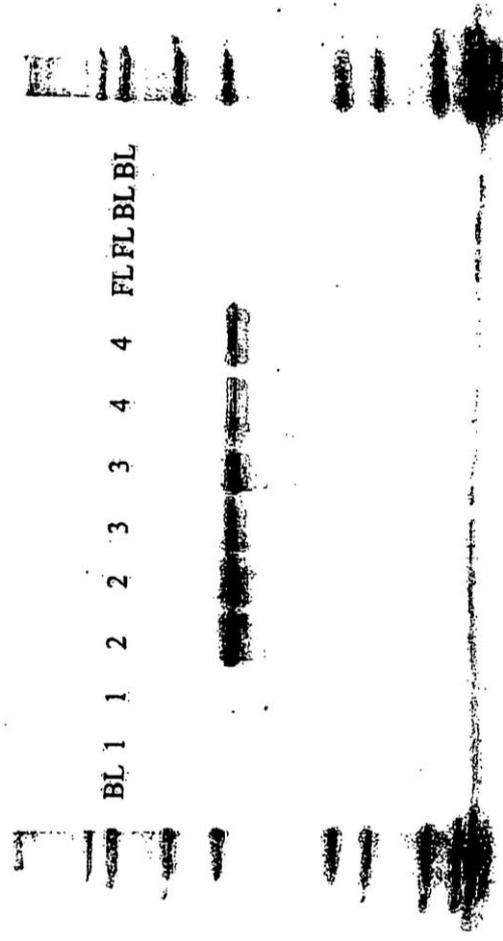


Figura 4

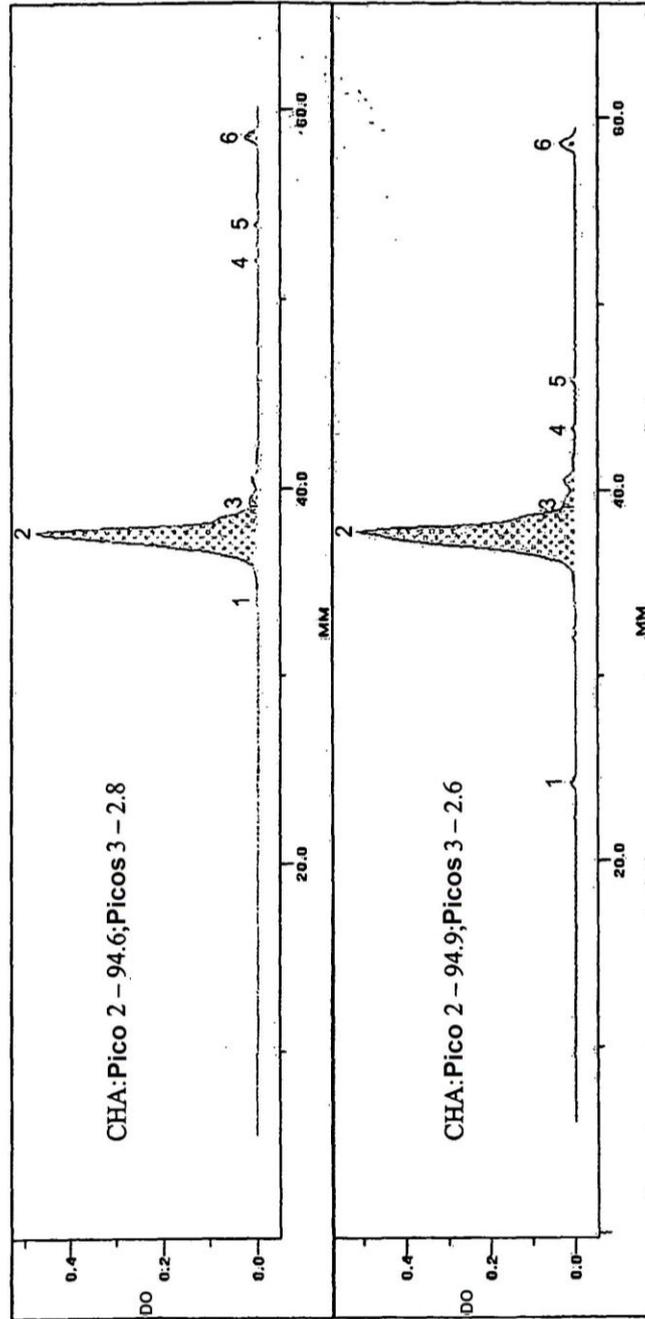


Figura 5