

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 500**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2008 E 08800101 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2195025**

54 Título: **Método de purificación de anticuerpos terapéuticos y método de uso**

30 Prioridad:

02.10.2007 US 976896 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.02.2014

73 Titular/es:

**CSL LIMITED (100.0%)
45 POPLAR ROAD
PARKVILLE VIC 3052, AU**

72 Inventor/es:

COX, JOHN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 442 500 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de purificación de anticuerpos terapéuticos y método de uso

5 Campo técnico

Esta invención se refiere a la preparación de inmunoglobulina. Más concretamente, esta invención se refiere a la preparación de una inmunoglobulina anti- β amiloide que puede ser adecuada para la inmunoterapia de la enfermedad de Alzheimer.

10

La invención se expone en las reivindicaciones.

Antecedentes

15 La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que, en su forma más común, se encuentra en personas mayores de 65 años. Aproximadamente 15 millones de personas en todo el mundo tienen la enfermedad de Alzheimer.

20 Los signos clínicos de la enfermedad de Alzheimer se caracterizan por deterioro cognitivo progresivo, junto con disminución de las actividades relacionadas con la vida diaria y por síntomas neuropsiquiátricos o cambios de comportamiento.

25 La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la acumulación de placa en los tejidos cerebrales que está compuesta de péptidos β amiloides. La administración de anticuerpos anti- β amiloide en un modelo de la enfermedad de Alzheimer en ratón parece reducir los depósitos de β amiloide en el cerebro del ratón y restaurar o aumentar la función cognitiva o al menos reducir la velocidad del deterioro cognitivo.

30 Hay anticuerpos naturales contra péptidos β amiloides presentes en el suero humano. La administración a seres humanos de preparados de inmunoglobulina humana obtenidos del suero humano se asocia a una disminución en los niveles de péptido β amiloide en el líquido cefalorraquídeo. [US2002/0009445.] Datos de un ensayo clínico reciente muestran resultados beneficiosos tanto en el comportamiento como en la cognición en pacientes con enfermedad de Alzheimer tratados con inmunoglobulina intravenosa ("IgIV") (<http://www.news-medical.net/?id=40383>).

35 Sin embargo, estos preparados de IgIV contienen cantidades significativas de péptidos β amiloides neurotóxicos y exhiben una variación significativa en la afinidad y el título del anticuerpo.

40 Previamente Duy et al., 2003, Brain, 126 1935 dieron a conocer la purificación de anticuerpos anti- β amiloide de inmunoglobulinas intravenosas humanas (IgIV) a pH 2.5. Estos anticuerpos se unieron a la proteína β amiloide y protegieron de la neurotoxicidad a neuronas del hipocampo de ratas.

Li et al., 2004, BMC Neurosci., 5 21 dieron a conocer varios métodos para disociar anticuerpos anti- β amiloide de la proteína β amiloide, incluidos el uso de DTT 100 mM, betamercaptoetanol al 0.5% y pH 2.5.

45 Li et al., 2007, BMC Neurosci., 8 22 dieron a conocer que la incubación a pH 3.5 puede disociar complejos β amiloide-anticuerpo.

50 US 2006/099211 dio a conocer un método para la preparación de anticuerpos específicos para β amiloide que comprende la disociación ácida de complejos de beta amiloide-anticuerpo a pH 2.5.

Chung et al., 1967, J. Lipid Res. 8 631 describieron la purificación de anticuerpos anti-LDL de complejos anticuerpo-LDL por ultracentrifugación a pH alcalino. El pH óptimo fue el pH 11, ya que a mayor pH (por ej. pH 11.5), el rendimiento se redujo debido a la agregación de la inmunoglobulina.

55 Resumen

Se proporcionan preparaciones de inmunoglobulina anti- β amiloide en condiciones alcalinas donde la proteína β amiloide es escasamente soluble y por lo tanto, menos capaz de volver a unirse a la inmunoglobulina anti- β amiloide. La invención se expone en las reivindicaciones.

60

En un aspecto, un método de preparación de una inmunoglobulina anti- β amiloide consiste en tratar una inmunoglobulina anti- β amiloide inicial en condiciones alcalinas, suficientes para disociar la proteína β amiloide, o uno de sus fragmentos, de dicha inmunoglobulina anti- β amiloide inicial.

Convenientemente, la inmunoglobulina anti- β amiloide preparada según el método está sustancialmente exenta de proteína β amiloide unida.

5 En otro aspecto, un método de preparación de una composición implica preparar una inmunoglobulina anti- β amiloide tratando una inmunoglobulina anti- β amiloide inicial en condiciones alcalinas suficientes para disociar la proteína β amiloide, o uno de sus fragmentos, de dicha inmunoglobulina anti- β amiloide inicial y combinar la inmunoglobulina anti- β amiloide con un vehículo, diluyente o excipiente aceptable.

10 Aún en otro aspecto, se proporciona una inmunoglobulina anti- β amiloide aislada o purificada, preparada tratando una inmunoglobulina anti- β amiloide inicial en condiciones alcalinas suficientes para disociar la proteína β amiloide, o uno de sus fragmentos, de dicha inmunoglobulina anti- β amiloide inicial.

15 Se proporciona un método de preparación de una composición que comprende una inmunoglobulina anti- β amiloide, donde dicho método incluye tratar una inmunoglobulina anti- β amiloide inicial en condiciones alcalinas suficientes para disociar la proteína β amiloide, o uno de sus fragmentos, de dicha inmunoglobulina anti- β amiloide inicial; y un vehículo, diluyente o excipiente aceptable.

20 La composición preparada por el método es adecuada para tratar una enfermedad o afección asociada a placas de β amiloide, tales como la enfermedad de Alzheimer.

25 Un método para tratar una enfermedad o afección asociada a placas de β amiloide en un mamífero, puede implicar administrar a dicho mamífero una inmunoglobulina anti- β amiloide preparada tratando una inmunoglobulina anti- β amiloide inicial en condiciones alcalinas para disociar la proteína β amiloide, o uno de sus fragmentos, de dicha inmunoglobulina anti- β amiloide inicial y de ese modo tratar dicha enfermedad o afección en dicho mamífero.

En una realización, la enfermedad o afección asociada a placas de β amiloide es la enfermedad de Alzheimer.

30 En toda esta memoria, a menos que el contexto requiera algo diferente, las palabras "comprender" "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros establecidos, pero no la exclusión de ningún otro número entero ni grupo de números enteros.

Breve descripción de las figuras

35 Figura 1: ELISA comparando la preparación de inmunoglobulina anti- β amiloide en presencia de (A) tampones de glicina: glicina HCl pH 2.5; glicina NaOH pH 10.25; glicina NaOH pH 10.75; glicina NaOH pH 11.25; y glicina NaOH pH 11.75.

Figura 2: ELISA comparando la preparación de inmunoglobulina anti- β amiloide en presencia de tampones de dietilamina HCl: pH 10.25; pH 10.75; pH 11.25; y pH 11.75 con un control de glicina HCl pH 2.5.

40 Descripción detallada

45 La proteína β amiloide unida específicamente se puede extraer de preparaciones de inmunoglobulinas anti- β amiloide en condiciones alcalinas. La purificación de inmunoglobulina anti- β amiloide IgIV en condiciones ácidas (por ejemplo aproximadamente pH 2) da como resultado proteína β amiloide soluble, que se puede volver a unir a la inmunoglobulina anti- β amiloide, particularmente cuando comienza la retroneutralización.

50 El tratamiento alcalino de la inmunoglobulina anti- β amiloide, incluso a un pH tan bajo como aproximadamente 10.5, disocia la proteína β amiloide de la inmunoglobulina anti- β amiloide, en las condiciones bajo las cuales la proteína β -amiloide sigue siendo sustancialmente insoluble e incapaz de volver a ser unida por la inmunoglobulina anti- β amiloide. El método es particularmente adecuado para la elaboración a gran escala o industrial de la inmunoglobulina anti- β amiloide a partir de IgIV humana.

55 La mayor eficiencia de la inmunoglobulina anti- β amiloide después del tratamiento en condiciones alcalinas a escala industrial proporciona un proceso más viable desde el punto de vista comercial para la producción de inmunoglobulina anti- β amiloide.

60 Un método de preparación de una inmunoglobulina anti- β amiloide consiste en tratar una inmunoglobulina anti- β amiloide inicial en condiciones alcalinas suficientes para disociar la proteína β amiloide unida a inmunoglobulina, o uno de sus fragmentos, de dicha inmunoglobulina anti- β amiloide.

Inmunoglobulina anti- β amiloide aislada o purificada preparada por el método descrito más arriba.

Por "aislada" se entiende presente en un ambiente fuera de un estado natural o de lo contrario sometida a manipulación humana. El material aislado puede estar sustancialmente o esencialmente exento de componentes

que normalmente lo acompañan en su estado natural, o puede ser manipulado para que esté en un estado artificial junto con componentes que normalmente lo acompañan en su estado natural.

5 Por "purificada" se entiende enriquecida, concentrada o de lo contrario que tenga una actividad, cantidad o concentración específica, mayor que la de un estado o forma inicial.

La inmunoglobulina anti- β amiloide aislada o purificada puede estar sustancialmente exenta de proteína β amiloide.

10 Por "sustancialmente exenta" se entiende que al menos 50%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95-99%, de las moléculas de inmunoglobulina anti- β amiloide no están unidas a, ni unidas por, la proteína β amiloide o sus fragmentos.

15 Según se usa en este documento una "proteína" es un polímero de aminoácidos que puede ser un péptido o un polipéptido. Generalmente, el término "péptido" según se usa en este documento es una proteína con no más de sesenta (60) aminoácidos contiguos.

20 El término "proteína β amiloide" comprende dentro de su ámbito de aplicación la proteína precursora del amiloide (APP) y sus fragmentos, incluidos, pero no exclusivamente, los fragmentos de péptidos descritos, por ejemplo, en la publicación de Estados Unidos 2006/0099211.

25 Se apreciará que según se usa en este documento, el término "inmunoglobulina" incluye cualquier proteína de unión al antígeno producto del complejo del gen de la inmunoglobulina humana, incluidos los isotipos de inmunoglobulina IgA, IgD, IgM, IgG e IgE y sus fragmentos de unión al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de unión al antígeno incluyen, pero no exclusivamente, Fab, F(ab)₂, Fv, scFv, etc.

Preferentemente, la inmunoglobulina anti- β amiloide preparada como se describió precedentemente es, o contiene, IgG.

30 Una fuente preferida de inmunoglobulina anti- β amiloide inicial o de partida es suero o plasma humano. Las preparaciones de inmunoglobulina obtenidas de esta fuente se administran habitualmente por diferentes vías que incluyen intramuscular, intravenosa o subcutánea y por lo tanto a menudo se hace referencia a ellas como "IgIM", "IgIV", "IgSC" o similar. Un ejemplo particular no limitante de una fuente para usar en el método es plasma, o una fracción del plasma obtenida por el proceso de fraccionamiento de Cohn, como el sobrenadante I de Cohn (plasma sin fibrinógeno) o la fracción II + III solubilizada y clarificada.

35 La inmunoglobulina anti- β amiloide inicial, como en la forma de IgIV, se puede deslipidar o reducir en euglobulina por métodos bien conocidos en el área, como se describe en lo sucesivo en los ejemplos.

40 La inmunoglobulina anti- β amiloide inicial puede ser sometida a por lo menos un paso cromatográfico de intercambio aniónico antes del tratamiento alcalino. En ciertas realizaciones, se pueden usar un primer y un segundo pasos cromatográficos secuenciales de intercambio aniónico. En otras realizaciones se puede usar una combinación de pasos cromatográficos de intercambio aniónico y catiónico.

45 Para lograr un pH alcalino para la disociación de la proteína β amiloide de la inmunoglobulina anti- β amiloide, se puede usar cualquier álcali adecuado, habitualmente en forma de una solución tampón. Dichos tampones alcalinos son bien conocidos en el área y un técnico con experiencia puede seleccionarlo fácilmente.

50 A modo de ejemplo solamente, los tampones alcalinos pueden ser tampones de carbonato, tampones de borato, tampón de fosfato ácido trisódico, dietilamina HCl, trietilamina HCl, glicina NaOH, 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol (AMPD), ácido N-tris(hidroximetil)metil-4-aminobutanosulfónico (TABS), ácido 3-[(1,1-dimetil-2-hidroxietil)amino]-hidroxipropanosulfónico (AMPSO), ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfónico (CHES), ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfónico (CAPSO), 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico (CAPS) y ácido 4-(ciclohexilamino)-1-butanosulfónico (CABS).

55 Un tampón alcalino preferido es dietilamina HCl.

Las condiciones alcalinas preferidas incluyen un pH en el rango de 8.5-11.75.

60 Más preferentemente el pH está en el rango 10.75-11.75.

Ventajosamente, el pH está en el rango 11.25-11.75.

La elución a pH alcalino (por ej., pH aproximadamente 11 o superior) produce agregados insolubles de proteína β amiloide que no se pueden volver a unir a la inmunoglobulina anti- β amiloide. Después el pH se puede neutralizar a

5 un pH más bajo (por ej. a aproximadamente pH 9) sin formar proteína β amiloide soluble. La proteína β amiloide insoluble se puede eliminar a ese pH antes de neutralizar posteriormente a un pH de formulación adecuado, generalmente en el rango de pH 4.0-7.4. Un ejemplo no limitante es aproximadamente pH 4.8 para las preparaciones de IgIV. Se apreciará que normalmente se utilizan condiciones de pH más bajas como pH 4.8 para las preparaciones de IgIV, dado que un pH más bajo ayuda a minimizar la formación de dímeros/agregados. Sin embargo se observa que las formulaciones de IgIM (donde se pueden tolerar niveles más altos de dímeros/agregados) pueden estar próximas a un pH neutro (por ej., aproximadamente pH 6.5).

10 Después, la eliminación de la proteína β amiloide se puede realizar por cualquier método conocido en el área. Los ejemplos no limitantes de dichos métodos incluyen filtración como nanofiltración y cromatografía por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba. Alternativamente, los agregados de β amiloide se pueden eliminar mediante centrifugación, como centrifugación de flujo continuo. Asimismo se apreciará que las formas solubles de la proteína amiloide β también se pueden eliminar, por ejemplo, por diafiltración usando una membrana de peso molecular de corte adecuado, de aproximadamente 10 a 30 kDa de corte.

15 En una realización no limitante, un método de preparación de una inmunoglobulina anti- β amiloide comprende:

(i) tratar una inmunoglobulina anti- β amiloide inicial con un tampón de dietilamina HCl a un pH en el rango de 10.75-11.75 para disociar así sustancialmente la proteína β amiloide unida de dicha inmunoglobulina anti- β amiloide;

20 (ii) neutralizar parcialmente el pH de (i) a pH 9;

(iii) eliminar la proteína β amiloide;

(iv) neutralizar el pH de (ii) a un pH en el rango de pH 4.0-7.4; y

(v) recoger la inmunoglobulina anti- β amiloide.

25 En otra realización, la preparación de inmunoglobulina anti- β amiloide se somete a inactivación viral. Preferentemente, la inactivación viral elimina los virus tanto con cubierta como sin cubierta. En una realización no limitante, se puede usar la exclusión por tamaño para eliminar virus tan pequeños como de aproximadamente 20 nanómetros.

30 En algunas realizaciones, el precipitado de β amiloide se somete al paso de filtración del virus en condiciones que permitan la eliminación tanto del virus como de la proteína β amiloide o sus fragmentos.

35 Las inmunoglobulinas anti- β amiloide preparadas como se describió antes pueden ser particularmente eficaces en las composiciones y los métodos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades o afecciones asociadas a las placas de β amiloide.

40 Un método para tratar una enfermedad o afección asociada a placas de β amiloide en un mamífero, puede implicar la administración a dicho mamífero de una inmunoglobulina anti- β amiloide preparada tratando una inmunoglobulina anti- β amiloide inicial en condiciones alcalinas para disociar la proteína β amiloide, o uno de sus fragmentos, de dicha inmunoglobulina anti- β amiloide inicial.

45 Un método de preparación de una composición puede implicar preparar una inmunoglobulina anti- β amiloide tratando una inmunoglobulina anti- β amiloide inicial en condiciones alcalinas suficientes para disociar la proteína β amiloide, o uno de sus fragmentos, de dicha inmunoglobulina anti- β amiloide; y combinar la inmunoglobulina anti- β amiloide con un vehículo, diluyente o excipiente aceptable.

50 Una composición puede contener una inmunoglobulina anti- β amiloide, preparada tratando una inmunoglobulina anti- β amiloide inicial en condiciones alcalinas para disociar la proteína β amiloide, o uno de sus fragmentos, de dicha inmunoglobulina anti- β amiloide; y un vehículo, diluyente o excipiente aceptable.

Los vehículos, diluyentes y excipientes pueden ser aceptables para uso farmacéutico, veterinario o inmunológico, como se entiende en el área.

55 En términos generales por "vehículo, diluyente o excipiente" se entiende un relleno sólido o líquido, aglutinante, diluyente, sustancia encapsulante, recubrimiento o lubricante que se pueda administrar con seguridad a un animal, preferentemente un ser humano. Dependiendo de la vía particular de administración, se pueden usar diversos vehículos, diluyentes o excipientes aceptables, bien conocidos en el área, como por ejemplo los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. EE.UU., 1991).

60 A modo de ejemplo solamente, éstos se pueden seleccionar de un grupo que incluye azúcares, almidones, celulosa y sus derivados, malta, gelatina, talco, sulfato de calcio, aceites vegetales, aceites sintéticos, alcoholes inferiores, polioles, ácido algínico, soluciones tamponadas de fosfato, emulsionantes, humectantes, lubricantes como estearato de sodio o magnesio, solución salina isotónica y agua apirógena.

Las preparaciones de inmunoglobulina anti- β amiloide han mejorado la eficacia terapéutica o reducido el riesgo de toxicidad de la proteína β amiloide luego de la administración a pacientes con enfermedad de Alzheimer.

5 Las preparaciones de inmunoglobulina anti- β amiloide del método reivindicado en la presente se pueden administrar a los pacientes por vía intravenosa o subcutánea para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer.

10 Las preparaciones de inmunoglobulina anti- β amiloide se pueden administrar en una sola dosis o en dosis repetidas una vez o varias veces durante un período determinado. La dosis apropiada varía según diferentes parámetros. Dichos parámetros incluyen el estado fisiológico de la persona tratada, la preparación de inmunoglobulina, el modo y la frecuencia de administración, y similares.

15 Las dosis de las preparaciones de inmunoglobulina anti- β amiloide pueden variar dependiendo de la edad, el peso y el estado fisiológico del paciente. A modo de ejemplo solamente, la inmunoglobulina preparada según la invención se puede administrar una vez por semana o una vez cada dos semanas o una vez cada cuatro, cinco, seis o más semanas. La cantidad de inmunoglobulina administrada puede variar y puede depender de la pureza, la afinidad y la avidez de la preparación de inmunoglobulina.

20 A modo de ejemplo solamente, la cantidad puede ser de aproximadamente 0.001 g a aproximadamente 10 g por kg de peso corporal; de aproximadamente 0.01 g a aproximadamente 5 g por kg de peso corporal; de aproximadamente 0.1 g a aproximadamente 3 g por kg de peso corporal; de aproximadamente 0.5 g a aproximadamente 2 g por kg de peso corporal o de aproximadamente 0.8 a aproximadamente 1.5 g por kg de peso corporal de la inmunoglobulina anti- β amiloide administrada a un paciente por dosis.

25 Un ejemplo no limitante de un régimen de dosificación humano clínicamente eficaz es de aproximadamente 0.2 g/kg una vez cada dos semanas o 0.8 g por kg una vez cada cuatro semanas.

30 Además de la enfermedad de Alzheimer en los seres humanos, las preparaciones de inmunoglobulina pueden ser adecuadas para usar en métodos como diversas aplicaciones veterinarias relacionadas a la inmunoterapia de los mamíferos no humanos como ganado, animales domésticos, animales amaestrados y análogos.

Ejemplos

Preparación a gran escala de IgIV tratada para eliminar proteína β amiloide unida.

35 La preparación de inmunoglobulina anti- β amiloide se puede fabricar según el proceso que se describe a continuación.

40 Son materiales de partida particularmente preferidos para usar en el método de la presente invención el plasma, o una fracción del plasma obtenida por el proceso de fraccionamiento de Cohn, como el sobrenadante I de Cohn (plasma sin fibrinógeno) o la fracción II + III solubilizada y clarificada.

45 Se ablanda plasma congelado típicamente 1250 kg a 10 000 kg de equivalentes plasma/plasma (6250-50 000 donaciones de sangre entera) a una temperatura de -5 °C, inmediatamente antes de ser descongelado en un período de 12 a 24 horas. El plasma descongelado forma un crioprecipitado y un criosobrenadante que contiene inmunoglobulina. El criosobrenadante se separa normalmente del crioprecipitado por centrifugación de flujo continuo donde la temperatura del efluente no excede de 5 °C.

50 Después la solución de criosobrenadante se puede diluir hasta 4-6% p/v y añadir suficiente etanol frío (95% v/v) a pH neutro para lograr una concentración de etanol de 8% v/v antes de ser incubado a -2 °C con el fin de precipitar fibrinógeno (fracción I). La fracción I se puede separar del sobrenadante que contiene inmunoglobulina (sobrenadante I) por centrifugación o filtración.

55 En realizaciones alternativas el sobrenadante I se puede exponer a altas concentraciones más elevadas de etanol para precipitar el componente de inmunoglobulina como fracción II + III. Después la fracción II + III se puede resolubilizar y clarificar por filtración para preparar un material de partida.

60 Cuando el material de partida es plasma u otro material con inmunoglobulina que contiene lipoproteínas, como el sobrenadante I, las lipoproteínas se separan preferentemente del material de partida por adsorción o precipitación en condiciones adecuadas para evitar o minimizar la pérdida de inmunoglobulina. Un material adsorbente particularmente preferido para usar de conformidad con la presente invención es un dióxido de silicio (sílice) finamente dividido adsorbente como Aerosil, que tenga por ejemplo un tamaño de partícula en el rango de 5-50 nm.

El sobrenadante I se mezcla con un auxiliar de filtración como Diacel 150 a 2-8 °C antes de agregar el Aerosil . La mezcla se agita hasta que se dispersan el Diacel y el Aerosil antes de ser filtrada con un filtro de prensa. El volumen retenido en el filtro de prensa se puede recuperar mediante lavado con NaCl 0.5 M.

5 La conductividad del sobrenadante I deslipidado se reduce con el fin de preparar una solución para cromatografía de intercambio aniónico. Esto se puede lograr usando una membrana de ultrafiltración con un corte nominal de no menos de 10 000 Dalton. Después de esto, el pH se ajusta a pH 5.2 para precipitar las proteínas tipo euglobulina. El precipitado que contiene euglobulina se elimina añadiendo a la mezcla un auxiliar de filtración como Diacel antes de ser filtrada con un filtro de prensa. El volumen retenido en el filtro de prensa se puede recuperar mediante lavado

10 con NaCl 0.5 M.

El material deslipidado y empobrecido en euglobulina preparado como se describió antes, se fracciona por cromatografía de intercambio aniónico para producir una primera fracción que contiene inmunoglobulina; y la purificación de la primera fracción que contiene inmunoglobulina con un segundo paso de cromatografía de intercambio aniónico proporciona una solución que contiene inmunoglobulina purificada.

15

Preferentemente, el material deslipidado se diafiltra, se le ajusta el pH y se empobrece en euglobulina antes de fraccionarlo por cromatografía de intercambio aniónico, empleando DEAE-Sefarosa FF en condiciones de carga, pH y fuerza iónica que maximicen la pureza de la inmunoglobulina (IgG cruda) obtenida en este paso. Preferentemente, el fraccionamiento del material deslipidado y empobrecido en euglobulina se realiza en una columna de DEAE-Sefarosa FF a pH 5.2 y una conductividad de 0.5-1.0 mS/cm. En particular, estas condiciones aseguran la separación máxima de la transferrina de las inmunoglobulinas aunque las propiedades fisicoquímicas de la transferrina se aproximan mucho a las de las inmunoglobulinas. La generación de una preparación de inmunoglobulina relativamente pura en este paso facilita el uso posterior de un segundo paso de intercambio aniónico para generar el producto final puro en condiciones de pH que aseguren que la capacidad de carga de la resina es adecuada para un proceso práctico comercial y que esa recuperación de sub-clase es apropiada.

20

El segundo paso de cromatografía de intercambio aniónico comprende la purificación de la fracción que contiene inmunoglobulina con resinas de intercambio aniónico macroporosas en condiciones de carga, fuerza iónica y pH que generan un producto altamente purificado con distribución de sub-clase intacta, baja concentración de IgA e IgM y niveles anti-A y anti-B dentro de los límites farmacopéuticos aceptados. Específicamente, el uso de resinas macroporosas con un tamaño de poro mayor de 100 nm (como Macro-Prep HQ, MacroPrep Q, Poros HQ, Q hyper DM) se puede utilizar a un pH de 6.0-6.6 y una conductividad de 0.7-1.5 mS/cm, para proporcionar capacidad adsorbente adecuada para eliminar las proteínas contaminantes, a fin de proporcionar una preparación que contenga inmunoglobulina G pura (IgG pura).

25

En otras realizaciones, donde el material de partida es fracción II + III resolubilizada u otro material que contenga inmunoglobulina que ya esté empobrecido en lipoproteína y parcialmente purificado, el material simplemente se somete a la purificación final por pasaje a través de una columna de resina macroporosa de intercambio aniónico como la descrita antes.

30

La solución de IgG pura se concentra después por ultrafiltración hasta aproximadamente 2% p/v y se le agrega un tampón adecuado (como glicina NaOH, etanolamina HCl o fosfato ácido disódico). La proteína β amiloide se disocia de la inmunoglobulina anti- β amiloide contenida en la solución de IgG pura ajustando el pH a 11.75 usando clorhidrato de dietilamina 0.2 M en un período de aproximadamente 2 horas en presencia de mezcla continua a 2-8 °C. La IgG pura con el pH ajustado se incuba mezclando durante al menos 30 minutos a pH 11.75. Después el pH se puede neutralizar a un pH más bajo (por ej. a aproximadamente pH 9) sin formar proteína β amiloide soluble.

35

El precipitado insoluble que contiene β amiloide se separa de la IgG pura cargando la solución en una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) (por ejemplo, Toyopearl 650C, Sepharose Fast Flow HIC, Source HIC o MacroPrep HIC) a menos de 40 g de proteína por L de resina. La columna se preequilibra en un tampón adecuado, como tampón de fosfato, en presencia de NaCl 1.5 M a un pH de aproximadamente 9.0. A continuación la IgG se eluye de la columna de HIC usando un gradiente lineal de 60 minutos de NaCl 1.5 M a 0 M a una velocidad de flujo de 60-200 cm/h. Después la proteína eluida se ajusta a pH 4.8 usando ácido clorhídrico 0.1 M o hidróxido de sodio 0.1 M y se almacena a 2-8 °C antes del procesamiento posterior.

40

En una realización alternativa el precipitado insoluble que contiene β amiloide se separa de la IgG pura cargando la solución en una columna de cromatografía hidrófoba inducida por carga (HCIC) (por ejemplo MEP Hypercel) a menos de 20 g de proteína por L de resina. La columna se preequilibra en un tampón adecuado, como tampón de fosfato o Tris a un pH neutro o básico. A continuación la IgG se eluye utilizando tampón de acetato de sodio 20 mM a pH 4.8. La preparación que contiene IgG eluida se puede almacenar a 2-8 °C antes de procesarla.

45

En una realización alternativa, el precipitado insoluble que contiene β amiloide se separa de la IgG pura mediante adición de un auxiliar de filtración (por ejemplo, Diacel) y opcionalmente NaCl 2 M y resina de HIC (como Toyopearl

50

55

60

650C, Sepharose Fast Flow HIC, Source HIC o MacroPrep HIC). La resina de HIC se agrega a menos de 40 mg de resina por L de proteína. La mezcla se agita a 2-8 °C durante al menos 30 minutos antes de ser clarificada por centrifugación o filtración. Después la solución clarificada se ajusta a pH 4.8 usando ácido clorhídrico 0.1 M o hidróxido de sodio 0.1 M y se almacena a 2-8 °C antes del procesamiento posterior.

5 Aún en otra realización el precipitado insoluble que contiene β amiloide se separa de la IgG pura cargando la solución en una columna de exclusión por tamaño que contiene una resina como Sephacryl S400HR. La fracción de inmunoglobulina se eluye de la columna usando un tampón como acetato de sodio 50 mM, pH 4.8 a 10-50 cm/h. El pH de la proteína eluida se ajusta después a pH 4.8 usando ácido clorhídrico 0.1 M o hidróxido de sodio 0.1 M y se almacena a 2-8 °C antes del procesamiento posterior.

10 En otra realización el precipitado insoluble que contiene β amiloide se separa de la IgG pura por centrifugación de flujo continuo.

15 Preferentemente, la preparación de inmunoglobulina anti- β amiloide se somete a inactivación viral, por ejemplo mediante dos pasos dedicados de depuración de virus: incubación a pH 4 a 37 °C durante 10 horas para inactivar los virus con cubierta y filtración de los virus para eliminar, por exclusión por tamaño, los virus con cubierta y sin cubierta tan pequeños como de aproximadamente 20 nanómetros.

20 En algunas realizaciones, el precipitado de β amiloide que contiene IgG pura se somete al paso de filtración viral en condiciones que permitan la eliminación tanto del virus como de proteína β amiloide.

25 Después a la preparación de inmunoglobulina anti- β amiloide inactivada viralmente se le ajusta el pH a 4.8 usando hidróxido de sodio 0.1 M y ácido clorhídrico de 0.1 M y concentrándola a aproximadamente 12% p/v por ultrafiltración usando una membrana de corte nominal de al menos 30 000 Dalton. La solución se diafiltra contra al menos 6 volúmenes de agua manteniendo el pH a 4.8 mediante la adición de ácido clorhídrico 0.1 M o hidróxido de sodio 0.1 M. La formulación final se logra agregando aproximadamente 250 mmol/L de L-prolina como estabilizador y diluyendo para obtener una concentración de 10% p/v en el producto final. Después del pasaje a través de filtros clarificantes la inmunoglobulina formulada a granel se pasa a través de un cartucho de membrana esterilizante previamente autoclavado con un tamaño de poro de 0.22 μ m o menos, en un recipiente donde se pueda almacenar a 2-8 °C antes de dispensar. El producto se distribuye asépticamente en frascos estériles de 1 mL, 5 mL, 10 mL y 50 mL.

35 Análisis de ELISA del tratamiento de pH de IgIV

Se recubrieron placas Nunc MaxiSorb de 96 pocillos placas (Thermo Fisher Scientific, NY) con el fragmento 1-40 amida de la proteína β amiloide (SIGMA, MO), mencionado en este documento como A β 1-40, a una concentración de 1 μ g/ml de solución salina amortiguada con fosfato (PBS), con 50 μ l por pocillo, durante toda la noche a 4 °C. Se eliminó el antígeno no unido por lavado de los pocillos con 350 μ l Tween-20 al 0.05% (Sigma, MO), PBS (TPBS). Se bloquearon las placas de antígeno recubierto y de blanco sin recubrir con 2% de seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma, MO), PBS, con 50 μ l por pocillo, durante 2 horas a temperatura ambiente. Se eliminó el BSA no unido por lavado de los pocillos con 350 μ l de TPBS.

45 Se diluyó IntragamP (CSL Limited, Parkville, Australia), mencionado en este documento como IgIV, hasta 20 mg/ml en PBS y después se diluyó 1/5 en glicina 0.2 M (Sigma, MO) a pH 2.5, 10.25, 10.75, 11.25 y 11.75; o dietilamina 0.2 M (Sigma, MO) a pH 10.25, 10.75, 11.25 y 11.75. Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente IgIV tratada por pH se neutralizó con un volumen igual de Tris HCl 2.0 M de pH 8.0 (Sigma, MO) y después se diluyó 1/2 en 1% de BSA, TPBS. La IgIV se diluyó en serie 3 veces en 1% de BSA TPBS, en una placa de 96 pocillos de fondo en V Nunc (Thermo Fisher Scientific, NY) y se transfirieron 100 μ l a las placas de BSA bloqueado. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente antes de eliminar la IgIV no unida lavando los pocillos dos veces con 350 μ l de TPBS.

55 Se transfirieron, 50 μ l por pocillo, de anticuerpo secundario anti-IgG humana (cadenas gamma) aislado por afinidad conjugado a HRP desarrollado en oveja (Millipore, MA) diluido 1/2000 en BSA al 1%, TPBS y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el anticuerpo secundario no unido por lavado de los pocillos con 350 μ l de TPBS. El ensayo se desarrolló con una solución de TMB/E (Millipore, MA), 50 μ l por pocillo, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para desarrollar el color y se detuvo con ácido fosfórico 2.0 M, 25 μ l por pocillo. La placa desarrollada se analizó a una absorbancia de 450 nm, 0.1 segundos en un lector de placas Wallac Victor 2 (Perkin Elmer, MA). Los resultados se muestran en la figura 1 y la figura 2.

60 Con referencia a la figura 1 y la figura 2, tanto los tampones alcalinos de glicina NaOH como de dietilamina HCl disociaron la IgG anti- β amiloide de las muestras de IgIV iniciales. Dietilamina HCl fue superior a glicina NaOH, particularmente a un pH superior a 11.25. Estos datos también demostraron que los tampones alcalinos de

ES 2 442 500 T3

dietilamina HCl a un pH superior a 11.25 (particularmente a pH 11.75), fueron superiores al tampón de glicina HCl a pH 2.5 para disociar IgG anti- β amiloide de las muestras iniciales de IgIV.

5 En consecuencia, se propone que los tampones alcalinos son adecuados para disociar las inmunoglobulinas anti- β amiloide de la proteína β amiloide.

Cabe destacar que los tampones alcalinos de dietilamina HCl a un pH en el rango de pH 11.25-11.75, se comportan mejor que el tampón ácido de glicina HCl a pH 2.5 probado en estos experimentos.

10 Se apreciará que con respecto a los rangos como los descritos antes (por ejemplo, pH, dosis etc.) cualquier valor establecido en un rango descrito en este documento se puede utilizar como un valor inferior o superior para construir otro rango, según corresponda.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de preparación de una inmunoglobulina anti-β amiloide que consiste en tratar una inmunoglobulina anti-β amiloide a un pH de 11.25 a 11.75 suficiente para disociar la proteína β amiloide, o uno de sus fragmentos, de dicha inmunoglobulina anti-β amiloide.
2. El método de la reivindicación 1 donde la inmunoglobulina anti-β amiloide se obtiene del plasma humano.
- 10 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además el paso de neutralizar al menos parcialmente hasta un pH menor sin formar proteína β amiloide soluble.
4. El método de la reivindicación 3, que comprende además el paso de eliminar la proteína β amiloide insoluble por filtración, cromatografía o centrifugación.
- 15 5. El método de la reivindicación 4, que comprende además el paso de neutralizar a un pH de aproximadamente 4.8.
6. Un método para preparar una inmunoglobulina anti-β amiloide de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:
- 20 (i) tratar una inmunoglobulina anti-β amiloide con un tampón de dietilamina HCl a un pH en el rango de 11.25-11.75 para disociar así sustancialmente la proteína β amiloide unida de dicha inmunoglobulina anti-β amiloide;
- (ii) neutralizar parcialmente el pH de (i) a pH 9;
- (iii) eliminar la proteína β amiloide;
- (iv) neutralizar el pH de (ii) a un pH en el rango de pH 4.0-7.4; y
- 25 (v) recoger la inmunoglobulina anti-β amiloide.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde (i) la inmunoglobulina anti-β amiloide preparada según el método está sustancialmente exenta de proteína β amiloide, (ii) la inmunoglobulina anti-β amiloide tiene actividad terapéutica con respecto a una enfermedad o afección asociada a placas de β amiloide y/o
- 30 (iii) el método comprende además un paso de inactivación viral.
8. Un método de preparación de una composición de una inmunoglobulina anti-β amiloide, donde dicho método consiste en tratar una inmunoglobulina anti-β amiloide a un pH de 11.25 a 11.75 suficiente para disociar la proteína β amiloide, o uno de sus fragmentos, de dicha inmunoglobulina anti-β amiloide; y combinar la inmunoglobulina anti-β amiloide con un vehículo, diluyente o excipiente aceptable.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, donde la composición es adecuada para tratar una enfermedad o afección asociada a placas de β amiloide en un mamífero.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicho mamífero es un ser humano.
- 40 11. El método de acuerdo con la reivindicación 9, donde la enfermedad o afección es la enfermedad de Alzheimer.

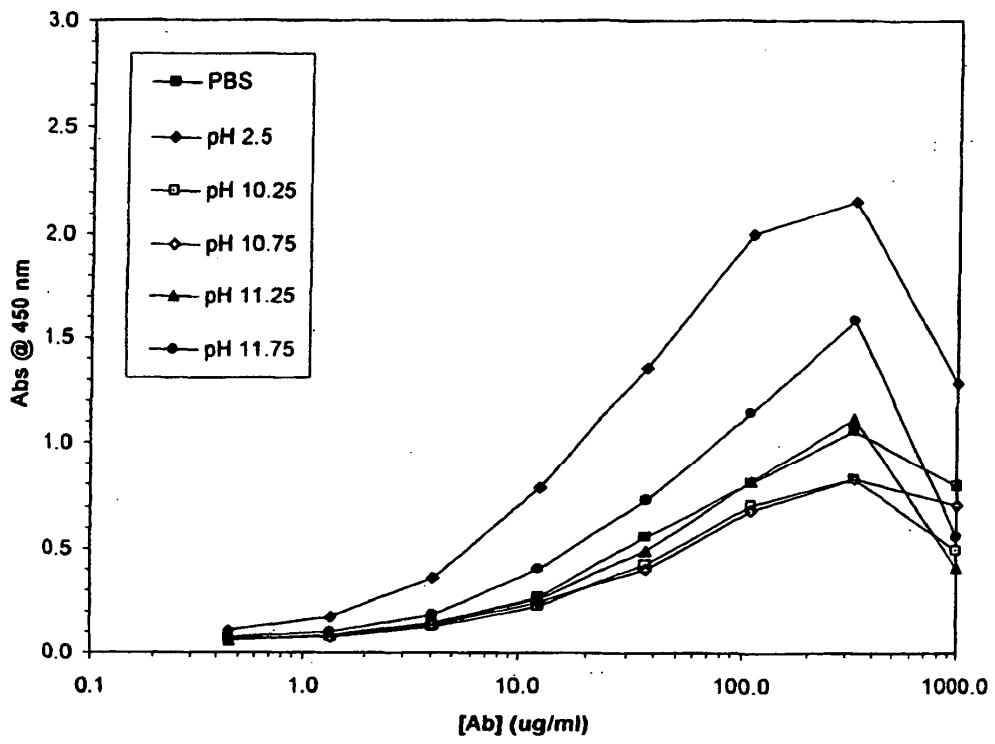


FIG. 1

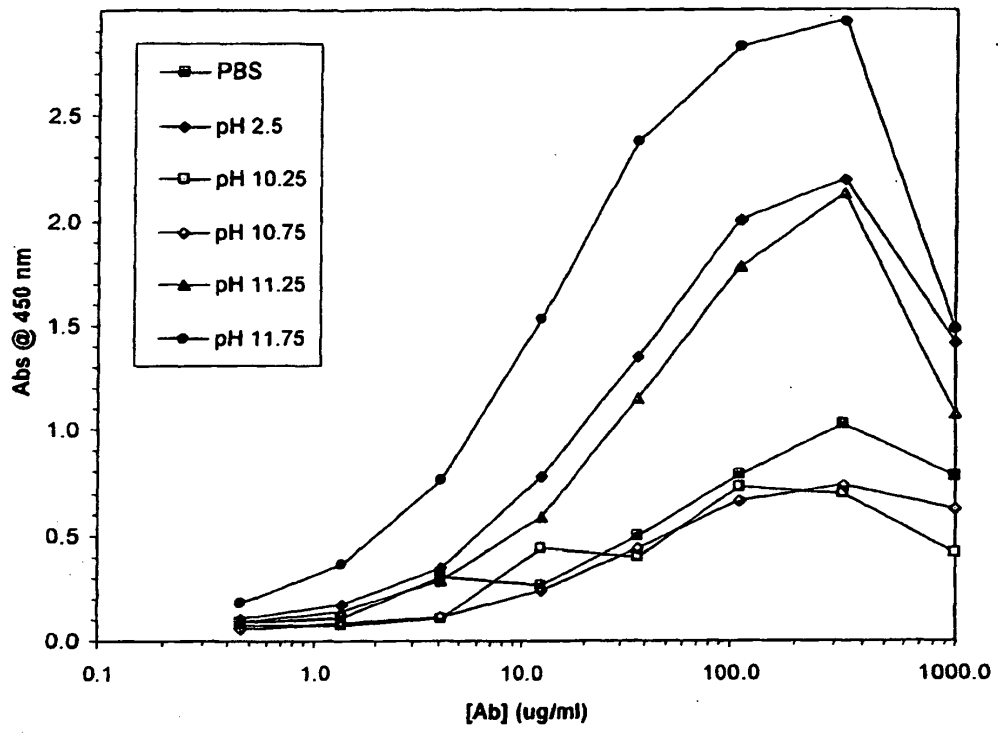


FIG. 2