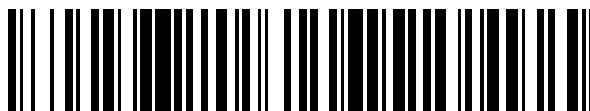


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 310**

51 Int. Cl.:

C07K 14/765 (2006.01)

A61K 38/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2008** **E 08380312 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016** **EP 2072056**

54 Título: **Procedimiento para la obtención de albúmina humana de alta eficacia para su uso en terapia de detoxificación**

30 Prioridad:

12.11.2007 ES 200702983

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

21.03.2016

73 Titular/es:

**GRIFOLS, S.A. (100.0%)
C/ JESÚS Y MARÍA, 6
08022 BARCELONA, ES**

72 Inventor/es:

**JORQUERA NIETO, JUAN IGNACIO;
RISTOL DEBART, PERE y
COSTA RIEROLA, MONTSERRAT**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 564 310 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención de albúmina humana de alta eficacia para su uso en terapia de detoxificación

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de albúmina humana con alta capacidad para el transporte de moléculas, para su utilización, entre otras aplicaciones, por ejemplo, en terapia de detoxificación o en cultivos celulares. La invención se basa en la experimentación llevada a cabo para conseguir purificar una albúmina humana con alta capacidad de enlace para el transporte de moléculas y con ello aumentar la eficacia de la
10 terapia de detoxificación por eliminación de toxinas en sangre, preferentemente por métodos de infusión de albúmina, por plasmaféresis y reposición de albúmina o bien mediante sistema extracorpóreo. El procedimiento comprende, según la invención, el proceso para la obtención de una solución de albúmina para uso terapéutico inactivada de virus y con alta capacidad de enlace, sin estabilizantes o con estabilizantes específicos que permiten conservar una elevada capacidad de enlace.

15 La esencialidad de la invención queda definida en la reivindicación 1.

Las reivindicaciones dependientes 2 a 22 definen otros aspectos preferentes de la invención.

ANTECEDENTES

20 Cuantitativamente, la albúmina es la proteína más importante del plasma humano y juega un papel fundamental en el mantenimiento de la presión osmótica coloidal de la sangre. La albúmina también presenta otras propiedades, como su actividad antioxidante y anti-radicales libres y también por su afinidad de unión a varias sustancias endógenas y exógenas, como lípidos, ácidos grasos, sales biliares, fármacos y sustancias tóxicas, entre otros
25 ligandos.

El uso terapéutico de la albúmina se ha indicado, según distintos autores, como terapia de sustitución en pacientes con deficiencia grave de albúmina, síndrome hipovolémico o shock (quemaduras graves, traumatismos, hemorragias), hipoproteinemia debida a enfermedades renales crónicas, cirrosis hepática y también en casos de
30 "bypass" cardiopulmonar, síndrome del distrés respiratorio agudo, hemodiálisis y hiperbilirrubinemia. La albúmina se usa también en el tratamiento de ascitis, nefrosis agudas, síndrome nefrótico agudo, pancreatitis, infecciones intraabdominales e insuficiencia hepática aguda.

Como principal molécula de transporte en la sangre, la albúmina sérica posee lugares de unión específicos para
35 sustancias lipófilas como ácidos grasos, bilirrubina, etc. La mayoría de ligandos de la albúmina se unen a uno de los dos sitios de unión I ó II. Los ácidos grasos libres, iones de metales como el cobre y la bilirrubina se unen selectivamente a dominios de unión específicos.

Normalmente estas sustancias son transportadas al hígado gracias a la albúmina, donde son degradadas. En
40 situaciones de fallo hepático estas sustancias tóxicas permanecen unidas a la albúmina saturando su capacidad de enlace, produciéndose un aumento de los niveles de toxinas en sangre, que se acumulan por tanto en los tejidos provocando un fallo general multiorgánico pudiendo provocar la muerte del paciente. En estos casos se puede realizar un tratamiento mediante sistemas extracorpóreos de apoyo hepático que aprovechan la capacidad de enlace
45 de la albúmina terapéutica comercial. El disponer de una albúmina con mayor capacidad de enlace podría representar una mayor eficacia de este tipo de tratamiento.

La capacidad de la albúmina para la captación y transporte de una gran variedad de sustancias, como metabolitos, metales, toxinas, ácidos grasos, hormonas, etc., confiere a esta proteína una gran importancia.

50 Los procesos de obtención de albúmina, a partir de plasma humano, parten habitualmente de la Fracción V (FrV) del fraccionamiento alcohólico del plasma según el método de Cohn (*Cohn y otros. J Am Chem Soc, 1946, 68, 459-475*). Aunque es menos frecuente, también pueden utilizarse otros materiales de partida, como sobrenadantes (S/N) de dicho fraccionamiento de Cohn, como el S/N de Fracción IV o S/N de Fracción II+III, incluyendo alguna etapa adicional de purificación, como por ejemplo la cromatografía de intercambio iónico.

55 Los métodos de purificación que parten de estos intermedios del fraccionamiento de Cohn, con una pureza de albúmina > 90 - 95 %, se basan habitualmente en la separación de polímeros, material agregado y otros compuestos como lipoproteínas, insolubilizados por efecto del etanol presente en la solución. Para una óptima separación de estos compuestos es conveniente la adición a la suspensión de albúmina de coadyuvantes de filtración (tierra de diatomeas) y/o silicatos inorgánicos insolubles (bentonitas) o sílice coloidal. Opcionalmente, y según el tipo de
60 contaminantes proteicos del material de partida, puede ser conveniente la adición de intercambiadores iónicos, manteniendo unas condiciones que prevengan la adsorción de la albúmina.

Posteriormente, la eliminación del etanol de la solución se realiza por diafiltración en equipos de ultrafiltración, que
65 permiten también la eliminación de iones metálicos y de aniones de ácidos carboxílicos orgánicos como el citrato (Patente española P 2.107.390). Esta ultrafiltración permite además llevar la solución de albúmina a la concentración

requerida.

Asimismo, también existe la posibilidad de efectuar un tratamiento térmico (preferentemente un choque térmico entre 56°C y 63°C) de la solución, a fin de desnaturalizar e insolubilizar cualquier compuesto termolábil remanente en la solución de albúmina que pudiera inestabilizar al producto final. Este tratamiento térmico es también útil para reducir la actividad del Activador de Precalicroina (PKA) que es uno de los contaminantes habituales de la albúmina.

Se han descrito hasta la actualidad diferentes métodos de purificación de albúmina, que representan variaciones a lo anteriormente descrito, en cuanto a secuenciación de etapas o adición de etapas adicionales de purificación.

Otros métodos contemplan la purificación de la albúmina por cromatografía de intercambio iónico, partiendo de la fracción V o del Sobrenadante de la FrIV, como la patente USA 5.346.992 o la EP 0367220. La patente USA 4.288.154 propone un proceso que parte del Sobrenadante de la Fr II+III, también por cromatografía de intercambio iónico, con una etapa previa de filtración en gel.

Las soluciones de albúmina humana para uso terapéutico obtenidas a partir de plasma por los métodos actualmente conocidos, se presentan como solución concentrada, generalmente con un 15% a 25% de proteína total, que son hiperosmóticas y producen un movimiento de los fluidos desde el compartimiento extravascular al intravascular, o como una solución isotónica del 3,5% al 5% de proteína total, que es isoosmótica con el plasma. La formulación de estas soluciones contiene albúmina, con una pureza superior al 95% del total de proteína, y estabilizantes.

Al obtenerse las soluciones de albúmina a partir de pools de plasma humano, al igual que para el resto de productos biológicos, no puede excluirse el riesgo de transmisión de infecciones por virus u otros agentes patógenos. A pesar de ello, la albúmina terapéutica actual es considerada un hemoderivado seguro frente a este riesgo. Ello se debe especialmente a que las soluciones de albúmina son pasteurizadas (tratamiento térmico de al menos 10 horas a 60-63 °C, realizado generalmente en vial final).

A partir de 1941, fecha en que se preparó la primera solución de albúmina procedente del fraccionamiento de plasma humano (*Cohn y otros. Chem. Rev., 1941, 28, 395*), se iniciaron estudios para la estabilización de las soluciones de albúmina y ya en 1945 se estableció la estabilización de la solución de albúmina con N-acetiltriptófano, con Caprilato sódico o con una mezcla de ambos (*Scatchard G, y otros, J. Clin. Invest. 24:671-676, 1945*). La estabilización de las soluciones de albúmina ha continuado siendo motivo de estudio (*Finlayson J.S. y otros, Vox Sang. 47:7-18, 1984*); (*Finlayson J.S. y otros, Vox Sang. 47:28-40, 1984*), pero se ha mantenido sin variaciones significativas hasta nuestros días, siendo aceptada esta forma de estabilización por las autoridades reguladoras de los diferentes países (por ejemplo: *European Pharmacopoeia; Human Albumin Solutions monograph 0255*). Así pues, en la actualidad, los preparados comerciales de albúmina llevan por lo general como estabilizantes caprilato y/o N-acetiltriptófano, con el fin de evitar la polimerización durante el proceso de pasteurización y asegurar la estabilidad durante el almacenamiento del producto hasta su caducidad.

En los casos en que el efecto terapéutico de la albúmina se produce al capturar compuestos tóxicos como mecanismo previo a su eliminación, como en el tratamiento de la hiperbilirrubinemia, la eficacia del tratamiento depende de que la albúmina presente libres los puntos de unión.

En estudios realizados en modelos de hiperbilirrubinemia en neonatos, Ebbesen F. (*Acta Paediatr. Scand. 71:85-90, 1982*) establece que el N-acetiltriptófano desplaza fuertemente a la bilirrubina, con lo que se reduce la eficacia de la albúmina estabilizada con N-acetiltriptófano y Caprilato, frente a una albúmina estabilizada solo con Caprilato. A pesar de que cualquiera de las dos preparaciones se muestra eficaz en la protección frente a la encefalopatía producida por la bilirrubina, los datos parecen indicar que la estabilización con N-acetiltriptófano no sería adecuada para el tratamiento de la hiperbilirrubinemia, mostrando la ventaja de la estabilización de la albúmina con Caprilato.

En otros estudios, realizados también sobre la afinidad y capacidad de unión de la albúmina a diferentes compuestos, entre ellos el Triptófano y el Caprilato, se ha establecido que se produce una competencia entre los diferentes compuestos por los puntos de unión de la albúmina (*Kragh-Hansen U. Biochem. J. (1991) 273, 641-644*) y se acepta que mientras que el Triptófano se une a la molécula de albúmina en un punto específico, el Caprilato (octanoato) se une a la molécula de albúmina en diferentes puntos, provocando una disminución en la capacidad de unión de la albúmina a otros compuestos.

Lo que en la actualidad esta fuera de toda duda es que estos estabilizantes se unen, al menos, al sitio de unión II de la albúmina y por lo tanto dificultan la función transportadora de la albúmina pasteurizada, pudiendo inhibir, al menos en parte, la unión de los ligandos endógenos (toxinas, etc.) después de la infusión intravenosa de dicha albúmina.

En este sentido se han realizado intentos para desarrollar métodos de producción de albúmina que eviten la utilización de N-acetiltriptófano y/o Caprilato sódico tanto durante el proceso de purificación como en la composición final.

La patente WO2004071524 muestra un proceso de preparación de albúmina que evita la inclusión de estabilizantes

de los grupos del N-acetiltriptófano y del Caprilato. Para ello se opta por una etapa de inactivación de virus por tratamiento con Solvente-Detergente (SD) en sustitución de la pasteurización. El tratamiento con SD ha mostrado una gran eficacia en la inactivación de virus con envoltura lipídica, pero no tiene ningún efecto significativo en la eliminación de virus sin envoltura. Otro inconveniente de este método es la necesidad de eliminar los reactivos de inactivación SD, lo que implica la inclusión de etapas de extracción que complican, alargan y encarecen el proceso. Finalmente, como hemos visto, la presencia de PKA en las soluciones de albúmina se reduce en parte por calentamiento. Al no realizar esta patente un tratamiento térmico, debe incluir además una etapa específica para la eliminación del mismo, complicando más si cabe dicho procedimiento.

La patente USA 5.919.907 realiza también un intento para conseguir una albúmina con mayor capacidad de enlace, mediante el desarrollo de un proceso que evita la pasteurización y con ello la adición de estabilizantes de los grupos del N-acetiltriptófano y del Caprilato. Este proceso aprovecha la capacidad biocida de los compuestos de yodo. Debido a la afinidad de la molécula de albúmina por el yodo y con ello la capacidad de la albúmina para neutralizar su efecto biocida, según esta patente este método requiere la adición de un compuesto de yodo en cantidad suficiente como para saturar la capacidad de unión de la albúmina y permitir además que quede suficiente yodo libre en la solución con efecto biocida. A este respecto, la reproducibilidad del proceso no parece fácil de asegurar, siendo este aspecto fundamental para una etapa de eliminación de patógenos. Por otra parte, este método requiere la eliminación del reactivo de inactivación, lo que implica también la inclusión de etapas de extracción que complican, alargan y encarecen el proceso. Otro aspecto a considerar, y que no se menciona en esta patente, es la presencia de PKA en las soluciones de albúmina. Como en el caso anterior, al no realizarse un tratamiento térmico, se debe incluir una etapa específica para la eliminación del PKA, lo cual complica el procedimiento.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Mediante las investigaciones realizadas, los inventores han constatado que la unión entre el Caprilato sódico y la molécula de albúmina es difícilmente reversible, lo cual provoca una menor capacidad de unión a toxinas de la albúmina estabilizada con caprilato. Además, los investigadores han constatado que la unión entre el N-acetiltriptófano y la albúmina (para uso terapéutico, preparada según el método de Cohn y sus modificaciones) es más fácilmente reversible. La posibilidad de estabilización con N-acetiltriptófano y sin caprilato permite la realización de un procedimiento para la obtención de albúmina que incluye una etapa de inactivación de virus por pasteurización, de forma tal que la albúmina se estabiliza en presencia de al menos un aminoácido y cloruro sódico, pero sin adición de ácidos grasos. Sorprendentemente, la implementación de un procedimiento de purificación de esta albúmina pasteurizada que incluye una diálisis (diafiltración) exhaustiva resulta en una mayor capacidad de enlace de la albúmina pasteurizada.

Según el procedimiento descrito en esta invención es posible realizar la etapa de inactivación de virus por pasteurización como fase intermedia de proceso. Con ello se consigue mantener el excelente nivel de seguridad mostrado por las albúminas terapéuticas conocidas hasta la actualidad, en cuanto al posible riesgo de transmisión de patógenos y conseguir una reducción del PKA.

Mediante el método desarrollado en la presente invención, es posible además obtener una albúmina con una capacidad de enlace superior incluso a la capacidad de enlace de la albúmina normal presente en el plasma, ya que el procedimiento desarrollado permite la reducción de compuestos (esencialmente lípidos y ácidos grasos) altamente asociados a la albúmina en estado natural y que provocan una reducción de su capacidad de enlace, y con ello una menor eficacia como captadora y transportadora de sustancias, por ejemplo en cultivos celulares y en terapia de detoxificación. El procedimiento permite además la reducción de los estabilizantes adicionados cuando se realiza la pasteurización en una fase intermedia de proceso. La albúmina así preparada tiene una muy alta capacidad para el enlace y transporte de moléculas y compuestos afines a la misma.

Para la preparación de esta albúmina de alta capacidad de enlace puede partirse de un concentrado de albúmina parcialmente purificada, por ejemplo en pasta (como precipitado). Un material de partida para dicha albúmina puede ser la Fracción V o Fracción VR (reprecipitada) obtenida por fraccionamiento alcohólico según método de Cohn (o versiones del mismo), o por otros procedimientos de fraccionamiento que permitan obtener una albúmina de pureza equivalente, típicamente $\geq 95\%$ en albúmina.

Otras fuentes de albúmina pueden obtenerse a partir de sobrenadantes (S/N) alcohólicos de dicho fraccionamiento de Cohn, por ejemplo del S/N de Fracción IV, o del S/N de Fracción IV(1)+IV(4), o de Fracción IV(4), o de otros sobrenadantes (S/N de Fracción IV(1) o S/N de Fracción II+III) a los que se les haya incluido alguna etapa adicional de purificación, por ejemplo de cromatografía, a fin de alcanzar el grado de purificación requerido ($\geq 95\%$ de albúmina).

La albúmina así purificada se solubiliza en un medio acuoso a una concentración superior al 1%, y típicamente al $8 \pm 2\%$ (p/p), siendo el pH resultante típicamente de $4,7 \pm 0,5$, y por tanto cercano al punto isoeléctrico de la propia albúmina.

Si la albúmina procede de Fracción V o de un sobrenadante del fraccionamiento de Cohn, el contenido de etanol

residual es normalmente $\geq 6\%$. En caso contrario se añade etanol hasta la concentración mínima indicada del 6%. Durante la adición de etanol o en la solubilización del material de partida, la suspensión se enfría a una temperatura de entre -3°C y 10°C y se mantiene en este rango de temperatura para prevenir los efectos desnaturalizantes del medio hidroalcohólico.

En estas condiciones se dejan precipitar los compuestos insolubilizados, añadiéndose a la suspensión de albúmina coadyuvantes de filtración (tierra de diatomeas) y/o silicatos inorgánicos insolubles (bentonitas) o sílice coloidal. Opcionalmente, y según el tipo de contaminantes proteicos del material de partida, es conveniente añadir intercambiadores iónicos inorgánicos del tipo perlita, o bien sintéticos con grupos funcionales amino/amonio (DEAE, QAE), por ejemplo DEAE-Sephadex, manteniéndose el pH entre 4,2-5,2 para prevenir la adsorción de la propia albúmina. En ausencia de intercambiadores iónicos el pH de la suspensión puede entonces llevarse desde 4,2 hasta 7,5, y preferentemente ajustarse a pH 6,8-7,2.

A continuación se clarifica la suspensión por filtración de profundidad, utilizando filtros cuyo entramado permita la retención de partículas de tamaño $\geq 0,2\text{ }\mu\text{m}$. El filtrado es una solución de albúmina esencialmente libre de residuos insolubles de proteína desnaturalizada y de otros compuestos (básicamente lipoproteína) insolubilizados por efectos del etanol.

El producto obtenido se somete a diafiltración por membranas de polietersulfona o equivalentes, cuyo corte molecular nominal se sitúa entre 1 y 50 kDa y preferentemente entre 10 y 30 kDa. La diafiltración frente a agua para inyección o preferentemente frente a una solución salina de concentración $\geq 0,15\text{ M}$ de NaCl, puede realizarse en las mismas condiciones de pH de 4,2 a 7,5 que se encuentra el filtrado procedente de la etapa anterior, pero preferentemente, y según la presencia lípidos, se optará por el ajuste a pH 4,2-5,2. Asimismo, la concentración salina también promueve la disociación de iones metálicos como el aluminio o el hierro y de aniones de ácidos carboxílicos orgánicos más fuertemente asociados, como el citrato.

De acuerdo a la técnica habitual de ultrafiltración se procede a una primera fase de concentración, llevándose hasta aproximadamente entre 8-15% de proteína y luego se realiza la diafiltración por adición de solvente a volumen constante. La cantidad de solución de diafiltración no debe ser inferior a 3 volúmenes, y preferentemente superior a 7 volúmenes.

La solución de albúmina ajustada a un pH cercano a la neutralidad, puede estabilizarse por adición de NaCl a una concentración $\geq 0,15\text{ M}$ y de al menos un aminoácido, utilizándose preferentemente una cantidad $\geq 0,096\text{ mmol}$ de N-acetiltriptófano/g de albúmina. Dicha solución estabilizada puede esterilizarse por filtración absoluta a través de $0,2\text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro, recogiendo en bulk como material intermedio y proceder a continuación a su pasteurización en esta fase.

La inactivación de virus por pasteurización presenta la ventaja de que es efectiva independientemente de que los virus tengan o no envuelta lipídica, siendo esto una clara ventaja respecto a los tratamientos químicos, con SD por ejemplo.

La solución bulk intermedio tratada térmicamente se clarifica por filtración y se somete a diafiltración exhaustiva para reducir los estabilizantes añadidos en la etapa precedente.

La segunda etapa de diafiltración se realiza en las mismas condiciones de aplicación que en la fase inicial antes del tratamiento térmico, teniendo en cuenta que la solución de albúmina final se lleva a isotonía (aproximadamente 0,15 M de NaCl), y la concentración proteica se ajusta al valor deseado, entre 3,5% y 25%, aproximadamente.

Dado que el N-acetiltriptófano utilizado como estabilizante se elimina extensamente de la forma indicada por diafiltración, el número de volúmenes de solución de diafiltración que se aplican se establece en función de la cantidad del estabilizante remanente.

De forma opcional, es posible la adición al proceso de una etapa de eliminación de virus por nanofiltración. La eliminación de virus por nanofiltración, al igual que la pasteurización, es igualmente efectiva independientemente de que se trate de virus envueltos o no. La eficacia de la nanofiltración está en función del tamaño de poro del nanofiltro empleado, condicionado por la solución a filtrar. En el caso de las soluciones de albúmina es posible la nanofiltración por tamaños de poro de 15 nm, con lo que se pueden garantizar reducciones significativas de los virus considerados más pequeños. La incorporación de una etapa de nanofiltración hasta poro de muy pequeño tamaño como complemento a la pasteurización no requiere la presencia de estabilizantes, con ello no se afecta la capacidad de enlace de la albúmina obtenida. Por otra parte la combinación de pasteurización y nanofiltración aumenta, si cabe aún más, el nivel de seguridad del producto.

Para proceder a la nanofiltración de la albúmina de forma que sea realmente efectiva frente al conjunto de virus transmisibles por la sangre, incluidos los más diminutos, se requiere que el contenido de los compuestos de alto peso molecular o agregados presentes en el producto sea muy discreto, para lo cual es preferible implementar dicha etapa en un estadio previo al tratamiento térmico.

Actualmente se han descrito el uso de nanofiltros comerciales de diferente tamaño de poro de filtración, cuya eficacia retentiva frente a virus varía en función del tamaño de poro seleccionado. Para la aplicación a la albúmina se pueden utilizar filtros de 50 nm, 35 nm, 20 nm y 15 nm, que pueden además acoplarse en serie, dos o más de ellos, formando un gradiente decreciente de tamaños de poro. También es posible la realización de una doble nanofiltración por el mismo tamaño de poro, lo cual incrementa la retención de posibles patógenos.

Las condiciones en cuanto a concentración de proteína son variables en función del tamaño de poro del nanofiltro. Así pues, para los tamaños menores de 15 y 20 nm es preferible diluir extensamente la albúmina hasta concentraciones inferiores al 5%, y preferentemente entre 0,5-2%. En cambio, cuando los tamaños de poro se hallan entre 35 y 50 nm, o superiores, es factible la nanofiltración directa a concentraciones $\geq 5\%$ de albúmina. Las condiciones de temperatura ambiente (18-25°C) y pH aproximadamente neutro, son las más adecuadas para facilitar la filtración.

En cualquier caso puede ser necesaria una etapa de concentración por ultrafiltración después de la nanofiltración a fin de ajustar a la formulación final deseada.

Una forma de conservación aceptable de la albúmina de alta eficacia de la invención es la liofilización, para lo cual no se requiere el uso de estabilizantes.

Para la conservación de la albúmina en solución puede ser necesaria la estabilización de la misma, lo cual puede realizarse con cloruro sódico $\geq 0,15$ M. La albúmina estabilizada de esta forma presenta una estabilidad correcta si es conservada en frío (entre 2 y 8 °C).

Otra forma de estabilización se realizaría con cloruro sódico $\geq 0,15$ M y N-acetilriptofanato, a una concentración $\geq 0,096$ mmol/gramo de albúmina y preferentemente a 0,16 mmol/gramo de albúmina. La solución estabilizada con esta formulación presenta una correcta estabilidad conservándose durante al menos 30 meses en líquido a una temperatura menor o igual a 30 °C, o bien un período menor de tiempo pero a temperatura más elevada. En cualquier caso debe evitarse la incorporación de ácidos grasos.

Para la determinación de la capacidad de enlace (ABiC) de la albúmina se utiliza un método basado en el cambio de fluorescencia que se produce al unirse un marcador fluorimétrico específico, como la dansilsarcosina, al sitio de unión II de la albúmina. Después de diluir las diferentes muestras de albúmina a la misma concentración e incubarlas con el marcador, se separan las moléculas de marcador no unidas por filtración, valorando mediante detección fluorimétrica la cantidad de dansilsarcosina libre (λ excitación=355 nm y λ emisión=460 nm). La capacidad de enlace se cuantifica de la siguiente manera:

$$\%ABiC = \frac{RFU \text{ albúmina referencia} - RFU \text{ blanco albúmina referencia}}{RFU \text{ muestra} - RFU \text{ blanco de muestra}} \cdot 100$$

(RFU: Unidades relativas de fluorescencia)

Determinada la capacidad de enlace por el método aquí descrito y tomando como referencia la capacidad de enlace de la albúmina natural del plasma humano (100 %), consideramos que una alta capacidad de enlace se sitúa en al menos un 80 % de la capacidad de enlace de la albúmina natural del plasma humano.

A los efectos de la presente invención se define como elevada capacidad de enlace de la albúmina, un valor de ABiC en % superior al de las albúminas comerciales estabilizadas con caprilato sódico o con una mezcla de caprilato sódico y N-acetilriptófano.

De manera específica, la presente invención consiste en un procedimiento para la obtención de una solución de albúmina humana, con una elevada capacidad para el enlace de moléculas de plasma humano que comprende:

- a) obtención de un filtrado de plasma de sangre, que es una solución de albúmina esencialmente libre de residuos insolubles de proteínas desnaturalizadas y otros compuestos insolubilizados por etanol, y una primera diafiltración;
- b) estabilización del producto de la etapa (a) con NaCl y N-acetilriptófano sin adición de ácidos grasos;
- c) pasteurización del producto de la etapa (b);
- d) una segunda diafiltración del producto de la etapa (c) hasta que el N-acetilriptófano se ha eliminado ampliamente; y
- e) estabilización del producto de la etapa (d) con $\geq 0,15$ M de NaCl.

Este procedimiento es aplicable a cualquier solución de albúmina independientemente de su procedencia, sea procedente de plasma humano, como obtenida por medios recombinantes o transgénicos.

El procedimiento para la obtención de la solución de albúmina con alta capacidad para el enlace de moléculas incluye el calentamiento de la solución de albúmina (pasteurización), con objeto de inactivar virus y reducir el

contenido en PKA. Este calentamiento se realiza a una temperatura de 61 ± 2 °C durante $10,5 \pm 0,5$ horas.

Para permitir el calentamiento de la solución de albúmina se procede a su estabilización con cloruro sódico (NaCl) a una concentración igual o mayor a 0,15 M y la adición de al menos un aminoácido. Este aminoácido es preferentemente N-acetilriptófano en una cantidad igual o mayor a 0,096 mmol de N-acetilriptófano/g de albúmina.

Este procedimiento se caracteriza específicamente por la no adición de ácidos grasos a la solución de albúmina.

El procedimiento descrito para la obtención de una solución de albúmina con alta capacidad para el enlace de moléculas, contempla la eliminación por diafiltración de sustancias ligadas a la albúmina, que reducen su capacidad de enlace. Estas sustancias ligadas a la albúmina pueden ser ligandos naturales, ya unidos a la albúmina antes de su purificación, o sustancias añadidas (estabilizantes) durante el proceso de purificación.

La eliminación por diafiltración de sustancias ligadas a la albúmina se realiza en dos etapas. La primera etapa de diafiltración se realiza antes de la estabilización para el calentamiento de la solución. La segunda etapa de diafiltración se realiza después del calentamiento (pasteurización) de la solución. En la segunda etapa de diafiltración se procede a la eliminación del aminoácido adicionado como estabilizante.

En el procedimiento descrito para la obtención de una solución de albúmina con alta capacidad para el enlace de moléculas, las etapas de diafiltración se realizan frente no menos de 3 volúmenes de solución de NaCl y preferentemente frente a 7 volúmenes. Con posterioridad a la diafiltración frente a una solución de NaCl, se diafiltra frente a agua para ajustar la concentración de sales de la solución al valor deseado.

La presente invención se describe con mayor detalle a partir de los siguientes ejemplos, a los cuales, no obstante, no debe limitarse.

Ejemplo 1: Comparación de la afectación de la capacidad de enlace de la albúmina (ABiC) por parte de los estabilizantes N-acetilriptófano y caprilato sódico.

Con el fin de conseguir una albúmina con una alta capacidad de enlace, se decidió valorar en que medida los estabilizantes caprilato sódico y N-acetilriptófano, usados habitualmente en la estabilización de preparados comerciales, afectaban la capacidad de enlace de una albúmina sin estabilizar.

Para ello se determinó la ABiC según el método establecido, pero tomando como referencia una albúmina sin estabilizantes. Se prepararon distintas soluciones de cada uno de los excipientes (N-acetilriptófano y caprilato), a concentraciones crecientes. Se incubó 1 ml de cada una de estas soluciones con 1 ml de albúmina sin estabilizantes (concentración final de la albúmina 1%). Después se añadió a cada una de las mezclas 1 ml de dansilsarcosina y se procedió de modo habitual con el método de cuantificación de la capacidad de enlace de la albúmina.

Los resultados obtenidos (figura 1) muestran como para una misma concentración de excipientes la capacidad de enlace de la albúmina es menor cuando se añade caprilato que cuando se añade N-acetilriptófano. Estos resultados apoyan una mayor afinidad a la albúmina por parte del caprilato que por parte del N-acetilriptófano.

Ejemplo 2: Comparación de la capacidad de enlace (ABiC) de la albúmina del plasma con distintos concentrados comerciales de albúmina y con una albúmina preparada según el método descrito en la presente invención, sin estabilizantes y estabilizada con N-acetilriptófano a 0,16 mmol/g.

Tomando como albúmina de referencia la capacidad de enlace que presenta la albúmina natural del plasma (100%) (columna A, figura 2) se observa que que en distintos concentrados comerciales de albúmina, con una concentración de estabilizantes, N-acetilriptófano y caprilato sódico entre 0,064 y 0,096 mmol/g albúmina, la capacidad de enlace es del mismo orden en todos ellos (48% a 57%) (columnas B a G) y del mismo orden que la capacidad de enlace de una albúmina comercial estabilizada únicamente con caprilato sódico (0,099 mmol/g albúmina) (52%) (columna H). Esta capacidad de enlace es inferior a la de la albúmina del plasma.

Se observa también la mayor capacidad de enlace de la albúmina obtenida según la presente invención, sin estabilizantes (127%) (columna I) o la estabilizada con N-acetilriptófano a 0,16 mmol/g (80%) (columna J) al compararla con los concentrados comerciales de albúmina.

Estos resultados indican, por una parte la ventaja del método de purificación descrito para la obtención de una albúmina con una superior capacidad de enlace, y por otra la interferencia importante por parte de los estabilizantes analizados, caprilato sódico y N-acetilriptófano, en la capacidad de enlace de la albúmina.

Ejemplo 3: Estabilidad de la solución de albúmina. Una solución de albúmina, a la concentración del 20 %, obtenida según el proceso descrito en la presente invención se estabiliza con cloruro sódico 0,15 M y con N-acetilriptofanato a una concentración de 0,16 mmol/gramo de albúmina y se procede al estudio de su estabilidad siguiendo las normativas vigentes para estudios de estabilidad, armonizadas a nivel internacional, Q5C "Stability testing of

Biotechnologicals /Biologicals products” y Q1A(R2) “Stability testing of new drugs substances and products”.

Los datos de estabilidad a tiempo real de 3 lotes de la albúmina indicada, muestran que el producto se mantiene estable. En concreto, la capacidad de enlace no presenta variaciones importantes respecto al inicio del estudio, al menos tras 30 meses de almacenamiento a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (figura 3). De hecho las oscilaciones observadas en los resultados de capacidad de enlace a lo largo del tiempo ocurren en paralelo a 5°C y a 30°C , por lo que son atribuibles a la propia variabilidad del ensayo, realizado en diferentes días, más que a una variación real de dicha capacidad de enlace.

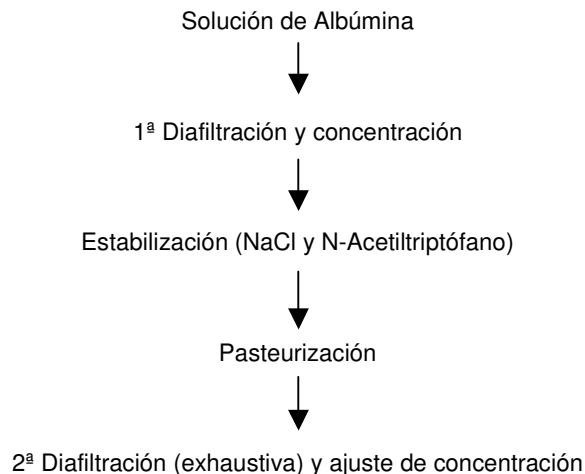
Ejemplo 4: Estabilidad de una solución de albúmina obtenida según el proceso descrito en la presente invención y estabilizada con cloruro sódico 0,15 M.

Los datos de estabilidad a tiempo real de la albúmina indicada, realizado a las temperaturas de almacenamiento de 5°C , 30°C y 40°C muestran que el producto se mantiene estable a la temperatura de 5°C . A esta temperatura, la capacidad de enlace (figura 4) no presenta variaciones importantes respecto al inicio del estudio y tampoco comparada con la albúmina estabilizada con N-Acetilriptófano. Los datos de Distribución molecular y de Turbidez (tabla 1) también apoyan la estabilidad de esta solución de albúmina.

Tabla 1
Estabilidad de la albúmina de la invención estabilizada con cloruro sódico 0,15 M

MESES	0	12
DISTRIBUCIÓN MOLECULAR:		
Polímero (%)	0	0
Dímero (%)	5,6	3,6
Monómero (%)	94,4	95,1
Fracciones (%)	0	1,3
TURBIDEZ (NTU)	5,0	5,3

El proceso de la invención se ilustra en el siguiente esquema



Tal como se aprecia por lo anterior, mediante las investigaciones realizadas sobre la estabilización de la albúmina y la eliminación de los estabilizantes asociados a la misma y su implicación en la capacidad de unión de la albúmina, los inventores han comprobado la gran ventaja del uso de una albúmina humana con una elevada capacidad de enlace para la terapia de detoxificación.

Esta albúmina humana usada en terapia de detoxificación se caracteriza por que su formulación final carece totalmente de estabilizantes o bien comprende agentes estabilizantes que resultan en una elevada capacidad de enlace.

Esta terapia de detoxificación puede ser realizada por infusión de albúmina al paciente, por plasmaféresis y reposición de albúmina al paciente o también realizarse en un sistema extracorpóreo.

Si bien la presente invención ha sido explicada en la anterior descripción de acuerdo con los ejemplos concretos que se indican, éstos no están destinados a limitar el alcance de la misma, de manera que se deberá considerar que quedan incluidas dentro del alcance de la presente invención todas aquellas variantes que queden comprendidas en el alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de una solución de albúmina humana con elevada capacidad de enlace de moléculas de plasma humano, que comprende:
5
a) obtención de un filtrado de plasma de sangre, que es una solución de albúmina esencialmente libre de residuos insolubles de proteínas desnaturalizadas y otros compuestos insolubilizados por etanol, y una primera diafiltración;
b) estabilización del producto de la etapa (a) con NaCl y N-acetiltryptófano sin la adición de ácidos grasos;
c) pasteurización del producto de la etapa (b);
10 d) una segunda diafiltración del producto de la etapa (c) hasta que el N-acetiltryptófano se ha eliminado ampliamente;
y
e) estabilización del producto de la etapa (d) con $\geq 0,15$ M de NaCl.
15
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la pasteurización es llevada a cabo a una temperatura de 61 ± 2 °C.
3. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que la pasteurización es llevada a cabo durante $10,5 \pm 0,5$ horas.
4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que en la etapa b), la estabilización es llevada a cabo por
20 añadidura de NaCl a una concentración de $\geq 0,15$ M y N-acetiltryptófano a una concentración de $\geq 0,096$ mmol/g de albúmina.
5. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la diafiltración es llevada a cabo frente a una solución de NaCl.
25 6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que la diafiltración es llevada a cabo frente a un mínimo de 3 volúmenes de solución de NaCl y preferentemente frente a 7 volúmenes.
7. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que después de la diafiltración frente a una solución de NaCl se lleva a cabo diafiltración frente a agua para ajustar la concentración de sales de la solución al valor deseado.
30 8. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que en la etapa e), la solución de albúmina es estabilizada adicionalmente con N-acetiltryptófano con una concentración de $\geq 0,096$ mmol/g de albúmina.

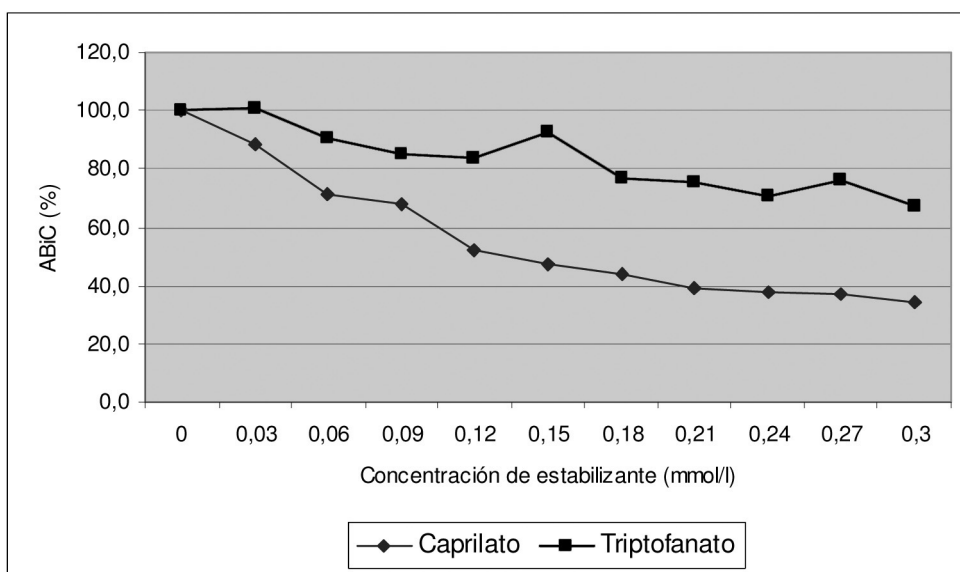


FIG. 1

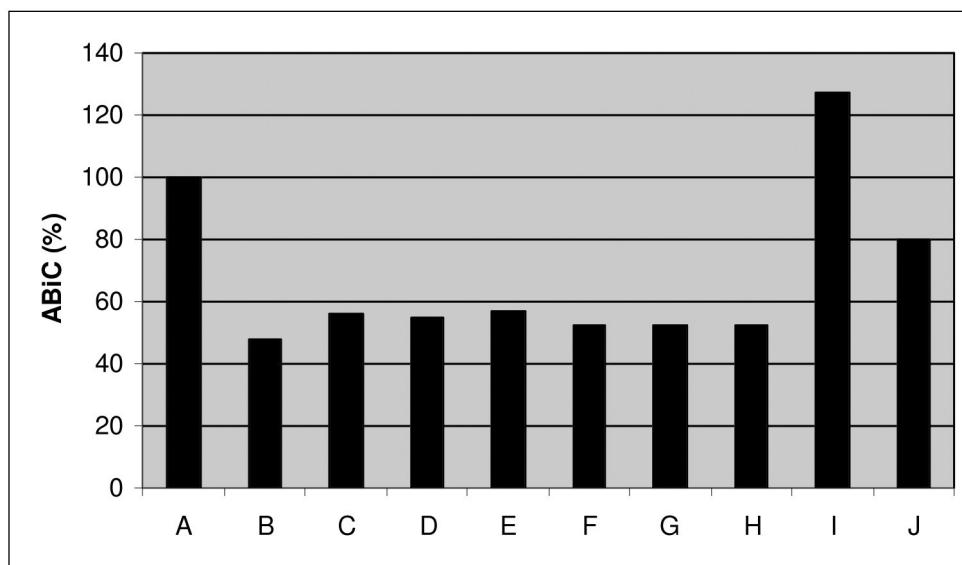


FIG. 2

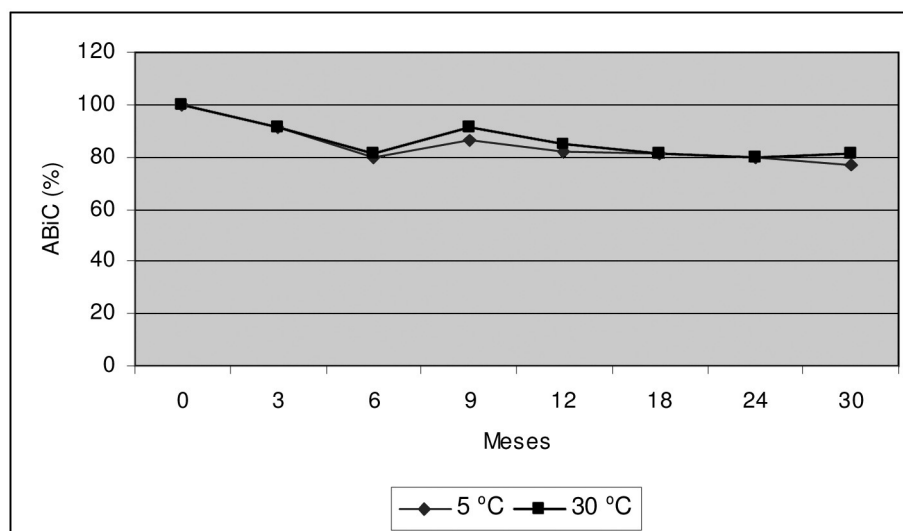


FIG. 3

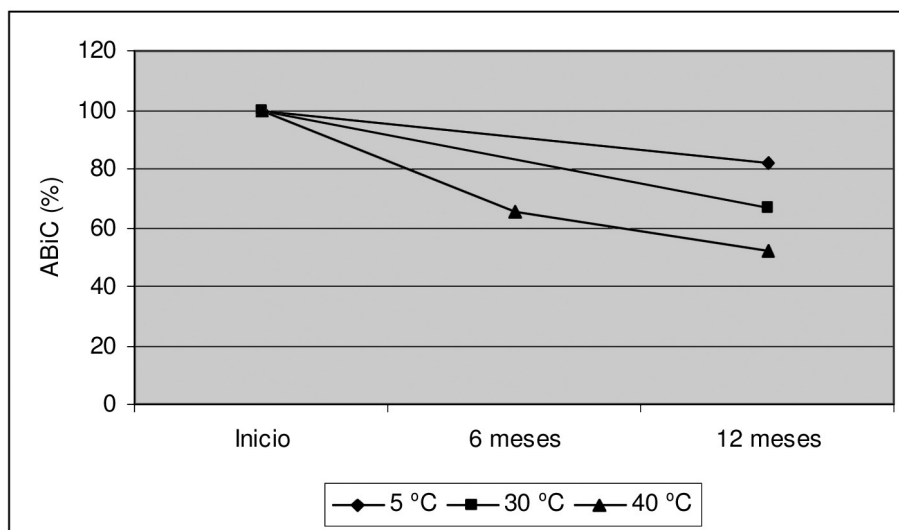


FIG. 4