

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 480**

51 Int. Cl.:

C07K 1/22 (2006.01)

C12N 9/50 (2006.01)

C12N 9/68 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2012** **PCT/IL2012/000258**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013** **WO13001524**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2012** **E 12746127 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016** **EP 2739642**

54 Título: **Método para eliminar una enzima lítica a partir de una mezcla heterogénea**

30 Prioridad:

30.06.2011 IL 21386411

30.06.2011 US 201161502905 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
01.02.2017

73 Titular/es:

OMRIX BIOPHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)
Bldg. 14 Weizmann Science Park P.O. Box 619
Rehovot 76106, IL

72 Inventor/es:

MEIDLER, ROBERTO;
RAVER-SHAPIRA, NINA;
BAR, LILIANA;
BELYAEV, OLEG y
NUR, ISRAEL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 599 480 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).

Método para eliminar una enzima lítica a partir de una mezcla heterogénea**Descripción****5 ÁREA DEL INVENTO**

[0001] Este invento se refiere a la purificación de una macromolécula de interés en su forma intacta y no degradada a partir de una mezcla que comprende a dicha macromolécula en la presencia de una enzima lítica.

10 ANTECEDENTES DEL INVENTO

[0002] Comúnmente, la purificación de macromoléculas intactas y no degradadas a partir de mezclas biológicas se dificulta debido a la presencia de enzimas líticas en estas mezclas. La presencia de enzimas líticas afecta la estabilidad de la macromolécula en la mezcla biológica al causar su degradación. Por lo tanto, la neutralización rápida de la enzima lítica en un paso temprano en el proceso de purificación es beneficiosa para incrementar la producción y la calidad (por ejemplo, la homogeneidad, la integridad y/o la funcionalidad) de la macromolécula purificada.

[0003] La purificación se complica aún más cuando la mezcla que comprende a la macromolécula es heterogénea (es decir comprende a partículas sólidas, es decir, a partículas precipitadas en una solución acuosa) y, por lo tanto, no puede exponerse a un proceso de purificación en el cual la mezcla pase con un caudal específico a través de una columna que contiene a una resina comprimida (denominado en este documento como "purificación de columna") sin agregar pasos previos, por ejemplo, la solubilización de las partículas, diálisis, filtraciones y/o similares para obtener a una solución clara.

[0004] La adición de aquellos pasos previos para remover a las partículas sólidas de la mezcla puede consumir tiempo y es caro y puede, además, remover, no deseablemente, a la macromolécula de interés, resultando, consecuentemente, en una producción baja de la macromolécula purificada.

[0005] Por ejemplo, la purificación de fibrinógeno en su forma intacta y no degradada a partir de una precipitación de hidróxido de aluminio [un subproducto del proceso de fabricación del factor VIII (FVIII)] se caracteriza por la presencia de un alto nivel de la enzima lítica plasmina y/o plasminógeno en la precipitación.

[0006] US 6,815,535 presenta a un método para obtener a una preparación enriquecida con fibrinógeno, por ejemplo, a partir de una pasta precipitada de heparina, un subproducto del proceso de fabricación de FVIII. El método incluye la adición de un monto efectivo de un polisacárido sulfatado (SPS - sulphated polysaccharide) a una solución que contiene fibrinógeno para formar a una precipitación que contiene fibrinógeno; y extraer al fibrinógeno de la precipitación que contiene fibrinógeno con una solución que contiene NaCl y el ácido ϵ -aminocaproico, un inhibidor soluble de la enzima proteolítica plasmina/plasminógeno.

[0007] La patente de Estados Unidos 7'125.569 presenta la remoción de plasmina/plasminógeno de una mezcla homogénea/clara utilizando a una columna comprimida con ácido tranexámico inmovilizado. Las patentes de Estados Unidos 4'341.764 y 4'455.300 presentan a fracciones diferentes de sus productos durante la fabricación de FVIII, es decir, la fracción residual de hidróxido de aluminio, que puede ser utilizada para la purificación de fibronectina y fibrinógeno.

[0008] GB 1480867 A presenta un método para remover a proteasas de proteínas que comprende el tratamiento de una solución proteínica con un inhibidor de proteasas insolubles en agua y enlazadas a un portador para remover a la proteasa de la proteína, la cual es, preferiblemente, calicreína.

[0009] WO 02/095019 A1 presenta a un método para remover o aislar específicamente a plasminógeno o plasmina en la presencia de fibrinógeno a partir de una mezcla que contiene a plasminógeno o plasmina mediante el contacto de la mezcla con un aminoácido rígido donde dicho aminoácido rígido está enlazado covalentemente con un soporte sólido mediante un grupo amino del aminoácido.

[0010] DD 204944 A1 presenta un proceso de separación de proteasas a partir de preparaciones de glucosa-oxidasa en las cuales las soluciones acuosas de la glucosa-oxidasa entran en contacto con un inhibidor inmovilizado de proteasas en una columna de separación o en un proceso de lotes y donde el complejo inmovilizado del inhibidor de proteasas permanece en la columna de separación o se separa mediante filtraciones.

[0011] Existe la necesidad de un método rápido y efectivo para purificar una macromolécula de interés en su forma intacta y no degradada a partir de una mezcla que comprende a dicha macromolécula en la presencia de enzimas líticas.

65 RESUMEN DEL INVENTO

ES 2 599 480 T3

[0012] Este invento se refiere a un método efectivo de purificación de una macromolécula de interés en su forma intacta y no degradada a partir de una mezcla que comprende a dicha macromolécula en la presencia de una enzima lítica.

5 **[0013]** Se puede obtener a la macromolécula purificada como resultado de la neutralización y de la remoción de la enzima lítica a partir de una mezcla en una etapa temprana en los pasos de purificación.

10 **[0014]** Por lo tanto, el invento también se refiere a un método para una neutralización eficiente y una remoción rápida de una enzima lítica presente en una mezcla biológica, donde la mezcla comprende a la enzima lítica y a una macromolécula de interés que es sensible a la degradación mediante la enzima lítica.

15 **[0015]** En un aspecto, el invento se refiere a un método para la remoción de una enzima lítica a partir de una mezcla biológica que contiene a la enzima lítica y a una macromolécula de interés que es sensible a la enzima lítica, donde el método comprende los pasos de: suministrar a la mezcla biológica como una mezcla heterogénea que contiene a la enzima lítica y a la macromolécula, donde por lo menos el 50% de la enzima lítica se disuelve y por lo menos el 50% de la macromolécula está presente en una forma sólida; suministrar a un inhibidor de la enzima lítica inmovilizado en un portador; contactar a la mezcla heterogénea con el inhibidor inmovilizado en lotes; incrementar la solubilidad de la macromolécula en la mezcla; y separar al inhibidor inmovilizado de la mezcla.

20 **[0016]** En una implementación del invento, la mezcla biológica comprende a una fracción celular seleccionada de un grupo que consiste de un extracto de plaquetas; un extracto de tejidos animales; un extracto óseo de animales; una mezcla enriquecida con gelatina o con colágeno proveniente de una fuente animal; una mezcla enriquecida con albúmina sérica bovina; una grasa inmiscible en agua derivada de animales; un extracto de cultivos celulares; o un exudado de cultivos celulares.

25 **[0017]** En otra implementación del invento, la mezcla biológica es, o se deriva de, un fluido corporal seleccionado de un grupo que consiste de semen, esputo, orina, heces, sudor, saliva, mocos nasales, fluido cerebroespinal y una fracción sanguínea.

30 **[0018]** En otra implementación del invento, la mezcla biológica es una precipitación proteínica.

[0019] En otra implementación adicional del invento, la precipitación proteínica es una precipitación criogénica.

35 **[0020]** En otra implementación del invento, la precipitación proteínica es un subproducto del proceso de fabricación del factor VIII y se selecciona de un grupo que consiste de precipitaciones ácidas, precipitaciones de enfriamiento, precipitaciones de hidróxido de aluminio, precipitaciones de glicina, precipitaciones de etanol y pasta precipitada de heparina.

40 **[0021]** En otra implementación adicional del invento, la precipitación proteínica es una precipitación de hidróxido de aluminio.

[0022] En una implementación del invento, la macromolécula es una proteína.

45 **[0023]** En otra implementación del invento, la enzima lítica es una proteasa.

[0024] En otra implementación adicional del invento, el inhibidor es un análogo de aminoácidos. En otra implementación adicional del invento, la macromolécula es fibrinógeno, la enzima lítica es plasmina y/o plasminógeno, y el inhibidor es un análogo de glicina. En una implementación del invento, el análogo de lisina es el ácido tranexámico.

50 **[0025]** En otra implementación del invento, la mezcla heterogénea es preparada al suministrar a una precipitación proteínica; y suspender a la precipitación con una solución acuosa bajo condiciones que retrasan la solubilización de la macromolécula y/o aumentan la solubilización de la enzima lítica.

55 **[0026]** En otra implementación del invento, las condiciones se seleccionan de un grupo que consiste de un rango de pH de 7.2-7.3, un rango de temperaturas de 30-32 °C, una concentración de etanol en el rango de 0.2 a 5%, y una de sus combinaciones.

60 **[0027]** En otra implementación del invento, las condiciones comprenden a un rango de pH de 7.2-7.3, un rango de temperaturas de 30-32 °C, y una concentración de etanol en el rango de 0.2 a 5%.

[0028] En otra implementación del invento, la precipitación proteínica está congelada.

65 **[0029]** En otra implementación del invento, el método comprende además el paso de reducir el tamaño medio de partículas de la precipitación congelada a alrededor de 2-8 mm antes de la suspensión.

ES 2 599 480 T3

[0030] En una implementación del invento, la reducción en el tamaño medio de partículas se ejecuta mecánicamente.

[0031] En una implementación del invento, la reducción en el tamaño medio de las partículas se ejecuta utilizando una licuadora.

[0032] En otra implementación del invento, el paso de contacto se ejecuta por más de 30 minutos.

[0033] En otra implementación del invento, el contacto de la mezcla heterogénea con el inhibidor inmovilizado se ejecuta durante 90 minutos.

[0034] En otra implementación del invento, el paso de separación se ejecuta mediante centrifugaciones y/o filtraciones.

[0035] En otro aspecto, el invento se refiere a un método para remover a la enzima lítica de una mezcla biológica precipitada que contiene a la enzima lítica y a una macromolécula de interés que es sensible a la enzima lítica, donde el método comprende los pasos de: facilitar a la mezcla biológica precipitada; facilitar un inhibidor de la enzima lítica inmovilizado en un portador; disolver parcialmente a la mezcla biológica precipitada con una solución acuosa para obtener una mezcla heterogénea que contenga a partículas sólidas que tengan a la macromolécula, donde la mayoría de las enzimas líticas están en una forma soluble y donde la mayoría de las macromoléculas están en una forma insoluble; contactar a la mezcla heterogénea con el inhibidor inmovilizado en lotes; disolver a las partículas sólidas en la mezcla; y separar al inhibidor inmovilizado de la mezcla.

[0036] En una implementación del invento, la mezcla biológica precipitada se deriva de un fluido corporal seleccionado de un grupo que consiste de semen, esputo, orina, heces, sudor, saliva, mocos nasales, fluido cerebroespinal, y una fracción sanguínea.

[0037] En otra implementación del invento, la mezcla biológica precipitada es una precipitación proteínica.

[0038] En una implementación adicional, la precipitación proteínica es una precipitación criogénica.

[0039] En otra implementación del invento, la mezcla biológica precipitada es una precipitación de un subproducto proveniente de un proceso de fabricación del factor VIII y se selecciona de un grupo que consiste de una precipitación ácida, una precipitación de enfriamiento, una precipitación de hidróxido de aluminio, una precipitación de glicina, una precipitación de etanol, y una pasta precipitada de heparina.

[0040] En otra implementación adicional del invento, la precipitación es una precipitación de hidróxido de aluminio.

[0041] En otra implementación del invento, la macromolécula es una proteína.

[0042] En otra implementación del invento, la enzima lítica es una proteasa.

[0043] En otra implementación, el inhibidor es un análogo de aminoácidos.

[0044] En una implementación del invento, la macromolécula es fibrinógeno, la enzima lítica es plasmina y/o plasminógeno y el inhibidor es un análogo de lisina.

[0045] En otra implementación del invento, el análogo de lisina es el ácido tranexámico.

[0046] En otra implementación adicional del invento, la mezcla biológica precipitada está congelada.

[0047] En otra implementación del invento, el método comprende además el paso de reducir el tamaño medio de las partículas de la mezcla biológica precipitada congelada a alrededor de 2-8 mm.

[0048] En una implementación del invento, la reducción del tamaño medio de las partículas se ejecuta mecánicamente, por ejemplo, mediante una licuadora.

[0049] En una implementación del invento, el paso de contacto se ejecuta por más de 30 minutos, por ejemplo, por 90 minutos.

[0050] En otra implementación del invento, el paso de separación se lleva a cabo mediante centrifugaciones y/o filtraciones.

[0051] En una implementación del invento, los pasos de disolver parcialmente a la mezcla biológica precipitada y de contactar a la mezcla heterogénea con el inhibidor inmovilizado se ejecutan simultáneamente.

[0052] En otra implementación del invento, las condiciones de disolución parcial son seleccionadas de un grupo que

consiste de un rango de pH de 7.2-7.3, un rango de temperatura de 30-32 °C, una concentración de etanol en el rango de 0.2 a 5%, y una de sus combinaciones.

5 [0053] En otra implementación adicional del invento, las condiciones de disolución parcial comprenderán a un rango de pH de 7.2-7.3, un rango de temperatura de 30-32 °C y una concentración de etanol en el rango de 0.2 a 5%.

10 [0054] En otro aspecto, el invento se refiere a un método para purificar a una macromolécula de una mezcla biológica que contiene a la macromolécula y a la enzima lítica específica para la macromolécula. El método comprende los pasos de: suministrar la mezcla biológica en forma de una mezcla heterogénea conformada de la enzima lítica y de la macromolécula, donde por lo menos el 50% de la enzima lítica está disuelta y por lo menos el 50% de la macromolécula está en una forma sólida; suministrar un inhibidor de la enzima lítica inmovilizado en un portador; contactar a la mezcla heterogénea con el inhibidor inmovilizado en lotes; incrementar la

15 [0055] Solubilidad de la macromolécula en la mezcla; y separar al inhibidor inmovilizado de la mezcla.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS ESQUEMAS

[0056]

20 La figura 1 muestra la concentración de fibrinógeno coagulable en el transcurso del tiempo de 2 muestras que contienen fibrinógeno que fueron purificadas de una precipitación de hidróxido de aluminio que contiene a la enzima proteolítica plasmina y/o plasminógeno. Las muestras fueron tratadas con o sin el ácido tranexámico inmovilizado (TEA - tranexamic acid) durante el proceso de purificación.

25 La figura 2 es un flujograma que muestra una implementación de un método para el enriquecimiento de fibrinógeno incluyendo la remoción de plasmina y de plasminógeno (la enzima lítica) de un material precipitado de hidróxido de aluminio. El TEA inmovilizado en geles es agarosa y fue utilizado como el inhibidor. El material precipitado estaba congelado. La composición del amortiguador de suspensión utilizado fue de: 480 ml de amortiguador (7 g de NaCl; 2.95 gramos de citrato de tri-sodio deshidratado; 8 mg/mililitro de albúmina sérica humana; y agua pura a 1 l; pH = 7.4); 6-40 ml de TEA-Sefarosa asentada; y 3.6 gramos de un 2% de Al(OH)₃; con un pH 7.4.

DESCRIPCIÓN DE LAS IMPLEMENTACIONES DEL INVENTO

35 [0057] Este invento se refiere a un método efectivo para purificar una macromolécula de interés en su forma intacta y no degradada a partir de una mezcla que comprende a dicha macromolécula en la presencia de enzimas líticas.

40 [0058] Los términos “macromolécula intacta” y “macromolécula no degradada” se refieren, por ejemplo, a la macromolécula natural, fisiológica, sin daños y/o funcional.

45 [0059] Este invento presenta un método para remover a la enzima lítica de la mezcla biológica que contiene a la enzima lítica y a una macromolécula de interés que es sensible a la enzima lítica. El método comprende los siguientes pasos: facilitar a la mezcla biológica en forma de una mezcla heterogénea que contiene a la enzima lítica y a la macromolécula donde por lo menos el 50% de la enzima lítica está disuelta y por lo menos el 50% de la macromolécula está en una forma sólida; facilitar un inhibidor de la enzima lítica inmovilizado en un portador; contactar a la mezcla heterogénea con el inhibidor inmovilizado en lotes; incrementar la solubilidad de la macromolécula en la mezcla; y separar al inhibidor inmovilizado con la enzima lítica enlazada de la mezcla.

50 [0060] Sin atarse al mecanismo, parece que contactar a la mezcla heterogénea que contiene a la enzima lítica con el inhibidor inmovilizado en lotes resulta en la formación de un complejo inmovilizado de inhibidor-enzima lítica.

55 [0061] El término “un complejo inmovilizado de inhibidor-enzima lítica” se refiere a una composición que tiene al inhibidor inmovilizado y a la enzima lítica asociados mediante enlaces covalentes o no covalentes. El término “enlaces no covalentes” incluye, pero no se limita a, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas o electrostáticas. El término “complejo” también incluye la forma plural de “complejos”.

60 [0062] Este invento también presenta un método para remover una enzima lítica de una mezcla biológica precipitada que contiene a la enzima lítica y a una macromolécula de interés que es sensible a la enzima lítica, donde el método comprende los siguientes pasos: facilitar la mezcla biológica precipitada que contiene a la enzima lítica y a la macromolécula; facilitar un inhibidor de la enzima lítica inmovilizado en un portador; disolver parcialmente a la mezcla biológica precipitada con una solución acuosa para obtener a una mezcla heterogénea que contiene a partículas sólidas que contienen a la macromolécula, donde la mayoría de la enzima lítica está en una forma soluble y donde la mayoría de la macromolécula está en una forma insoluble; contactar a la mezcla heterogénea con el inhibidor inmovilizado en lotes; disolver las partículas sólidas en la mezcla; y separar al inhibidor inmovilizado con la enzima lítica enlazada de la mezcla.

[0063] El término “remover a una enzima lítica de una mezcla” se utiliza intercambiamente con el término “reducir el nivel de una enzima lítica en la mezcla”, y se refiere a reducir el contenido de la enzima lítica en la mezcla.

5 **[0064]** El término “mezcla biológica precipitada” se refiere, comúnmente, a una mezcla biológica que contiene precipitaciones tales como materiales insolubles y/o sólidos.

10 **[0065]** La mezcla biológica precipitada puede ser facilitada, por ejemplo, al cambiar cualquier parámetro en una mezcla de una solución biológica que reduce la solubilidad de las moléculas en la solución tal como la temperatura, el pH, y la concentración de solventes orgánicos; y entonces, la fracción sólida/insoluble puede separarse y recolectarse, por ejemplo, mediante filtraciones, precipitaciones a lo largo del tiempo, por la fuerza gravitacional y/o después de una centrifugación.

15 **[0066]** El término “disolver parcialmente a la mezcla biológica precipitada” se refiere, comúnmente, a disolver incompletamente a una precipitación con una solución acuosa que conlleva a la formación de una solución heterogénea que contiene a partículas sólidas y/o no disueltas que son visibles a simple vista.

20 **[0067]** En una implementación del invento, las condiciones de disolución parcial comprenden a un nivel de pH de 7.2-7.3. En otra implementación del invento, las condiciones de disolución parcial comprenderán un rango de temperatura de 30-32 °C. En otra implementación adicional del invento, las condiciones de disolución parcial comprenden a una concentración de etanol en el rango de 0.2 al 5%. En otra implementación del invento, las condiciones de disolución parcial comprenden a un nivel de pH de 7.2-7.3, un rango de temperatura de 30-32 °C, y una concentración de etanol en el rango de 0.2 a 5%. En una implementación del invento, la disolución parcial se ejecuta durante un periodo de tiempo de menos de 90 minutos (por ejemplo, menos de 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 minutos). Se descubrió, de acuerdo a este invento, que el suspender a una fracción precipitada de hidróxido de aluminio y exponer a la precipitación a una solución conformada de ácido tranexámico (TEA - tranexamic acid) inmovilizado permitió la remoción de aproximadamente el 80% de plasmina y/o plasminógeno de la precipitación suspendida. Por lo tanto, en una implementación del invento, se removió alrededor del 80% (por ejemplo, 80 ± 20%) de la enzima lítica. El término “macromolécula sensible a una enzima lítica” se refiere a una macromolécula que puede degradarse y/o desactivarse, por lo menos parcialmente, por la enzima lítica. Se descubrió, de acuerdo a este invento, que el exponer a una precipitación de hidróxido de aluminio a TEA inmovilizado (un inhibidor de la enzima proteolítica plasminógeno/plasmina) en una etapa temprana en el proceso de purificación de la macromolécula de fibrinógeno (una macromolécula que es sensible a, y que puede ser degradada por, el plasminógeno/plasmina) resultó en una preparación con niveles incrementados de fibrinógeno funcional en comparación a una preparación obtenida en la ausencia del TEA inmovilizado. Además, se descubrió, sorpresivamente, de acuerdo a este invento, que al agregar al inhibidor inmovilizado (TEA inmovilizado) en una precipitación suspendida bajo condiciones que retrasaron la solubilización de la macromolécula y/o aumentaron la solubilización de la enzima lítica (formando una mezcla heterogénea), se obtuvo una neutralización eficiente y una remoción rápida de la actividad de la enzima lítica lo cual resultó en una preparación óptima con fibrinógeno funcional. Más específicamente, se descubrió, sorpresivamente, de acuerdo a este invento, que la neutralización de la enzima lítica ocurrió incluso cuando la precipitación no se había disuelta completamente (es decir, estaba parcialmente solubilizada).

45 **[0068]** Sin atarse al mecanismo, parece que la enzima lítica (estando en una forma soluble) es accesible y puede ser neutralizada y/o capturada por el inhibidor inmovilizado mientras que la macromolécula (estando en una forma insoluble) no es accesible y se presume que está protegida de la lisis por la enzima lítica. Con el tiempo, ocurre la solubilización gradual de la macromolécula, y se reduce la concentración y/o la actividad de la enzima lítica libre en la mezcla (puesto que la mayoría de la enzima lítica se inhibe y/o se captura por el inhibidor inmovilizado), y, por lo tanto, la macromolécula solubilizada está protegida de la lisis de la enzima lítica.

50 **[0069]** Más particularmente, se descubrió, de acuerdo a este invento, que utilizar un inhibidor inmovilizado, en vez de un inhibidor soluble, permitió, en general, una fácil remoción de la mayoría de la actividad de la enzima lítica con el aglutinamiento del inhibidor inmovilizado y otros materiales no deseables para el proceso tales como hidróxido de aluminio, por ejemplo, mediante centrifugaciones y/o filtraciones.

55 **[0070]** Comparativamente, en el caso que el inhibidor soluble sea una molécula pequeña (por ejemplo, el ácido tranexámico de alrededor de 150 Daltons) su remoción de la mezcla, después de su uso, es factible solamente al ejecutar varios pasos exhaustivos de exclusión tales como ultrafiltraciones y diafiltraciones.

60 **[0071]** En una implementación como esa (donde se usa una molécula pequeña como el inhibidor), debido a la diferencia de la masa molecular entre la enzima lítica y el inhibidor soluble (comúnmente, la masa molecular de la enzima lítica es de alrededor de decenas de kilodaltons o más y la masa molecular de los inhibidores solubles es comúnmente menor que un kilo Dalton), el inhibidor soluble puede removerse de la mezcla por medio de filtraciones mientras que la enzima lítica permanecerá en la mezcla y su actividad lítica será restaurada lo cual no es deseable.

65 **[0072]** Además, se descubrió, de acuerdo al invento, que contactar a la enzima lítica con el inhibidor mediante el método de lotes permite la purificación de macromoléculas intactas en los casos en que la mezcla que comprende a

las macromoléculas sea heterogénea y, por lo tanto, no pueda purificarse mediante una resina pre-comprimida en una columna (denominada en este documento como "purificación de columna") sin agregar pasos adicionales anteriores para obtener una solución homogénea y clara (por ejemplo, solubilizaciones de partículas, diálisis y/o filtraciones). Adicionalmente, en lotes, la superficie de interacción y velocidad de interacción entre la enzima y el inhibidor son mayores que cuando se las compara con la purificación de columna, lo cual expide el proceso de neutralización de la enzima lítica.

[0073] El término "purificación de columna" se refiere, generalmente, a una técnica en la cual se le permite a una mezcla viajar a través de una columna que contienen a una resina comprimida a un caudal específico, y un componente individual está siendo absorbido por la resina. Generalmente, la purificación de columna requiere la remoción de material de partículas, por ejemplo, mediante centrifugaciones y/o filtraciones (para obtener una solución homogénea/clara) puesto que las columnas de cromatografía convencionales se construyen rápidamente por partículas. El material que no se ha enlazado se recauda del otro lado de la columna después de que la mezcla pasa a través de esta. La purificación de columna es una técnica bien conocida en la industria tal como se describe en Practical Protein Chromatography (Cromatografía Proteínica Práctica) editada por Kennedy y Fowell volumen 11 Humana Press, 1992.

[0074] Tal como se utiliza en este documento, el término "método de lotes", "en forma de lotes", y "en lotes" se refiere, generalmente, a una técnica en la cual se contacta a una mezcla con una resina, comúnmente en un procedimiento de absorción de una sola etapa. El término "procedimiento de absorción de una sola etapa" se refiere a un procedimiento en el cual todos los componentes del proceso de purificación (por ejemplo, la resina y la mezcla) se incuban juntos, por ejemplo, en un tanque de agitación, en un reactor de lotes o en un matraz, y la absorción se ejecuta en una forma continua. La fracción no enlazada puede ser recaudada entonces mediante un paso adicional de centrifugación y/o o de filtración.

[0075] En una implementación del invento, se contacta a la mezcla con la resina en un contenedor, por ejemplo, un tubo de ensayo, y después de un periodo de incubación, se centrifuga al contenedor y se recolecta al sobrenadante que contiene a la macromolécula. El método de lotes puede ejecutarse en un contenedor o en un reactor de lotes.

[0076] El término "resina" se refiere a un "portador" tal como se define más adelante lo cual comprende, comúnmente, a un inhibidor inmovilizado.

[0077] Los hallazgos de acuerdo al invento abrieron el camino para el desarrollo de un método para purificar rápidamente y eficientemente a una macromolécula funcional y/o intacta de interés a partir de una mezcla biológica heterogénea que contienen a una enzima lítica y a la macromolécula de interés mediante una neutralización y remoción rápida de la enzima lítica presente en la mezcla. En la mezcla heterogénea, la enzima lítica se encuentra, sustancialmente, en una forma soluble mientras que la macromolécula está, sustancialmente, en una forma insoluble.

[0078] El término "completamente soluble" se refiere a una disolución del 100%, por ejemplo, sin ninguna partícula sólida. El término "parcialmente soluble" se refiere a que la enzima lítica puede tener una disolución de alrededor de 50% a menos de 100%. Por ejemplo, el 50, el 55, el 60, el 65, el 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 95, el 99 o menos del 100%, incluyendo cualquier rango entre los porcentajes presentados tales como el 50-55%, el 50-60%, el 50-65%, el 50-70%, el 50-75%, el 50-80%, el 50-85%, el 50-90%, el 50-95%, el 50-99%, el 55-60%, el 55-65%, el 55-70%, el 55-75%, el 55-80%, el 55-85%, el 55-90%, el 55-95%, el 55-99%, el 60-65%, el 60-70%, el 60-75%, el 60-80%, el 60-85%, el 60-90%, el 60-95%, el 60-99%, el 65-70%, el 65-75%, el 65-80%, el 65-85%, el 65-90%, el 65-95%, el 65-99%, el 70-75%, el 70-80%, el 70-85%, el 70-90%, el 70-95%, el 70-99%, el 75-80%, el 75-85%, el 75-90%, el 75-95%, el 75-99%, el 80-85%, el 80-90%, el 80-95%, el 80-99%, el 85-90%, el 85-95%, el 85-99%, el 90-95%, el 90-99%, el 95-99%.

[0079] En una implementación del invento, la enzima lítica está disuelta en un 50 a un 95%. Los porcentajes son de la enzima lítica total que está presente en la mezcla.

[0080] El término "completamente insoluble" se refiere a que el 100% está en forma sólida, por ejemplo, congelada. El término "parcialmente insoluble" se refiere a menos del 100% en una forma sólida, por ejemplo, la macromolécula puede estar en un estado sólido desde alrededor del 50% a menos del 100%, por ejemplo, el 50, el 55, el 60, el 65, el 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 95, el 99 o menos del 100%, incluyendo a cualquier rango entre los porcentajes presentados tales como el 50-55%, el 50-60%, el 50-65%, el 50-70%, el 50-75%, el 50-80%, el 50-85%, el 50-90%, el 50-95%, el 50-99%, el 55-60%, el 55-65%, el 55-70%, el 55-75%, el 55-80%, el 55-85%, el 55-90%, el 55-95%, el 55-99%, el 60-65%, el 60-70%, el 60-75%, el 60-80%, el 60-85%, el 60-90%, el 60-95%, el 60-99%, el 65-70%, el 65-75%, el 65-80%, el 65-85%, el 65-90%, el 65-95%, el 65-99%, el 70-75%, el 70-80%, el 70-85%, el 70-90%, el 70-95%, el 70-99%, el 75-80%, el 75-85%, el 75-90%, el 75-95%, el 75-99%, el 80-85%, el 80-90%, el 80-95%, el 80-99%, el 85-90%, el 85-95%, el 85-99%, el 90-95%, el 90-99%, el 95-99%. En una implementación del invento, la macromolécula está en una forma sólida en un 50 a un 95%. Los porcentajes son de las macromoléculas totales que están presentes en la mezcla.

[0081] Una mezcla biológica puede comprender a una fracción celular tal como a un extracto de plaquetas; un

extracto de tejidos animales; un extracto óseo de animales; una mezcla enriquecida con gelatina o colágeno de una fuente animal; mezclas que contienen albúmina sérica bovina; grasa inmiscible en agua derivada de un animal; un extracto de cultivo celular; o un exudado de cultivos celulares tales como proteínas recombinantes o fracciones de extractos bacterianos tales como cuerpos de inclusión.

[0082] El término “extracto de plaquetas” se refiere a una mezcla que comprende a factores derivados de plaquetas. Comúnmente, los extractos son libres de células.

[0083] El término “animal” tal como se utiliza en este documento incluye a sujetos mamíferos y humanos.

[0084] La mezcla biológica puede derivarse de fluidos corporales de mamíferos y humanos. En una implementación, la mezcla biológica puede ser semen, esputo, orina, heces, sudor, saliva, mocos nasales, fluidos cerebroespinales, y una fracción sanguínea, es decir, un producto de sangre completa tal como una precipitación criogénica, plasma o suero. La mezcla biológica puede ser una precipitación proteínica.

[0085] La mezcla biológica puede ser una fracción precipitada de plasma humana, una fracción precipitada de una precipitación criogénica suspendida o una fracción precipitada de plasma humano.

[0086] La precipitación puede ser una precipitación criogénica. El término “precipitación criogénica” se refiere a un componente sanguíneo que se obtiene de plasma congelado preparado a partir de sangre completa, plasma recuperada o de una fuente de plasma que se recolecta mediante plasmáfesis. Se puede obtener a una precipitación criogénica cuando el plasma congelado es descongelado lentamente en el frío, comúnmente a una temperatura de 0-4 °C, lo que resulta en la formación de una precipitación que contiene fibrinógeno y el factor XIII. La precipitación puede recolectarse, por ejemplo, mediante centrifugación.

[0087] La precipitación puede ser un subproducto del proceso de fabricación de VFIII, por ejemplo, una precipitación ácida, una precipitación de enfriamiento, una precipitación de hidróxido de aluminio (refiérase, por ejemplo, a la patente de Estados Unidos 4'455.300), una precipitación de glicina (refiérase, por ejemplo, a la patente de Estados Unidos 4'297.344), una precipitación de etanol y pasta precipitada de heparina.

[0088] El término “subproducto” se refiere a un material no deseado y/o que no fue elaborado a propósito y/o que no fue utilizado y/o un material residual producido usualmente o formado en el transcurso de un proceso industrial o biológico en adición al material/producto deseado.

[0089] El término “precipitación” y “fracción precipitada” son intercambiables.

[0090] En una implementación del invento, la precipitación proteínica es una precipitación de hidróxido de aluminio. Ventajosamente, cuando una precipitación comprende a hidróxido de aluminio, el hidróxido de aluminio puede ser removido fácilmente de la precipitación suspendida junto con proteasas que dependen de la vitamina K, por ejemplo, mediante centrifugaciones y/o filtraciones. En contraste, cuando una precipitación comprende a heparina, la heparina no puede removerse fácilmente de la precipitación suspendida mediante centrifugaciones y/o filtraciones puesto que la heparina se solubiliza en la solución acuosa. Incluso si la heparina pudiese ser removida mediante procesos más complejos, por ejemplo, ultra filtraciones, enzimas líticas desinhibidas, las proteasas se quedarán atrás en la solución libres para atacar a la macromolécula de interés.

[0091] Tal como se utiliza en este documento, el término “enzimas líticas” se refiere a una enzima capaz de degradar específicamente o no específicamente a moléculas de sustratos. El término enzima lítica incluye, pero no se limita a, enzimas que degradan proteínas (es decir, proteasas tales como colágenasas, plasmina, y/o plasminógeno), grasas (es decir, lipasas), ADN (es decir ADNasas), ARN (es decir, ARNasas), almidones (es decir, amilasas), y celulosa (es decir, celulasas). En una implementación del invento, el tamaño de la enzima lítica está en el rango de alrededor de decenas de kilo Daltons o más.

[0092] El término “una macromolécula de interés” se refiere comúnmente a cualquier macromolécula presente en una mezcla la cual se desea purificar, e incluye a cualquier bio - polímero tal como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, por ejemplo, el glicógeno y la celulosa. Comúnmente, las macromoléculas proteínicas tienen una masa molecular que varía entre las decenas a los millones de kilo Daltons o más.

[0093] El término “una enzima lítica” podría referirse a una sola o a una mezcla de enzimas líticas y el término “una macromolécula” podría referirse a una sola o a una combinación de macromoléculas. En una implementación del invento, la macromolécula es una proteína y la enzima lítica es una proteasa (es decir, una enzima proteolítica). En otra implementación, la proteína es fibrinógeno (masa molecular de alrededor de 270.000-340.000 Daltons). En una implementación adicional del invento, la enzima proteolítica es plasmina y/o su zimógeno plasminógeno [denominado en este documento “plasmin(ógeno)” con una masa molecular de alrededor de 75.000-90.000 Daltons]. En una implementación adicional del invento, la macromolécula en la mezcla biológica es grasa inmiscible en agua y la enzima lítica es una lipasa. En una implementación como esa, para obtener a una mezcla heterogénea, la mezcla biológica puede mantenerse a temperaturas bajas y a temperaturas por sobre la temperatura de congelamiento. En

aquellas condiciones, se disuelve la lipasa en agua la cual es accesible para su inhibidor mientras que las grasas inmiscibles en agua están en una forma insoluble y no pueden ser alcanzadas por la lipasa para su degradación. El término "mezcla heterogénea" se refiere, en este documento, a una mezcla que comprende a sólidos, que están parcialmente disueltos y/o no han sido solubilizados y no pueden pasar, a través de, o ser sujetos a, una purificación de columna (por ejemplo, una cromatografía de afinidad, una filtración de gel, un intercambio de iones, o una interacción hidrofóbica) sin agregar a pasos adicionales anteriores de clarificación u homogenización, por ejemplo, la solubilización de partículas, diálisis, filtraciones y/o similares.

[0094] Agregar pasos previos para remover las partículas de la mezcla puede consumir tiempo y puede ser caro y también puede remover, en una forma inconveniente, a la macromolécula de interés que está presente en la mezcla en una forma sólida insoluble, lo cual resulta en una baja producción de la macromolécula purificada. Ventajosamente, el método del invento se ejecuta sin remover a las partículas sólidas de la mezcla lo cual resulta en una producción incrementada de la macromolécula purificada. En una implementación del invento, la producción de la macromolécula es de por lo menos el 90%.

[0095] Una mezcla heterogénea generalmente se refiere a una mezcla que comprende a un líquido y a partículas, por ejemplo, partículas sólidas y/o insolubles. En una implementación, la mezcla heterogénea se compone de alrededor del 50 al 95% (masa/masa) de fase líquida. En otra implementación, la mezcla heterogénea se compone de alrededor del 5 al 50% (masa/masa) de partículas sólidas y/o insolubles. En una implementación adicional, la mezcla heterogénea está compuesta de un 80% (masa/masa) de la fase líquida y de un 20% (masa/masa) de partículas insolubles y/o sólidas. Los porcentajes que se acaban de mencionar se refieren a la fracción del líquido y las partículas en la mezcla cuando se empieza a ejecutar el método. Sin embargo, con el tiempo las partículas podrían disolverse y la tasa, tomando en cuenta la masa, de las partículas sólidas y/o insolubles en relación a la fase líquida podría alterarse.

[0096] En una implementación del invento, la mezcla heterogénea comprende a partículas precipitadas suspendidas en una solución acuosa.

[0097] La mezcla heterogénea comprende a la mayoría de enzimas líticas en una forma soluble y a la mayoría de las macromoléculas en una forma insoluble.

[0098] Se descubrió, de acuerdo a este invento, que puede obtenerse una mezcla heterogénea a partir de una precipitación al suspender a la precipitación con una solución acuosa bajo condiciones que retrasan a la tasa de solubilización de la macromolécula y/o aumentan la tasa de solubilización de la enzima lítica. Estas condiciones se alcanzaron, por ejemplo, mediante el ajuste del nivel de pH a 7,2-7,3, de la temperatura a 30-32 °C, y al reducir la concentración de etanol de alrededor del 5% a alrededor del 1%.

[0099] Asimismo, se puede suministrar a una mezcla heterogénea empezando con partículas sólidas que contienen a la enzima lítica y a la macromolécula (por ejemplo, un pellet), y suspendiendo a las partículas sólidas con una solución acuosa bajo condiciones que retrasan la solubilización de la macromolécula en la mezcla. Alternamente, o en paralelo, se puede manipular la solubilidad de la enzima lítica, por ejemplo, agregando agentes que conllevan a la carga de sal de la enzima tal como la adición de cloruro de sodio o agentes caotrópicos tales como la urea o el clorhidrato de guanina.

[0100] El término "pellet" se refiere a la fracción insoluble y/o sólida de la solución que está separada de la solución debido a un cambio en cualquier parámetro que reduce la solubilidad de las moléculas en la solución tal como la temperatura, el pH, y la concentración de solventes orgánicos; y/o se refiere a una acumulación de moléculas proteínicas lo suficientemente grandes para poder verse a simple vista y que pueden recaudarse mediante centrifugaciones a alrededor de 10.000 g. La fracción insoluble y sólida y/o la acumulación de moléculas proteínicas pueden recolectarse, por ejemplo, mediante filtraciones, precipitaciones a lo largo del tiempo por la fuerza gravitacional y/o después de centrifugaciones.

[0101] El término "pellet", en ocasiones, se usa intercambiamente con el término "precipitación". Se pueden presentar a las partículas insolubles y/o sólidas, de acuerdo al método del invento, en un estado congelado. Un "estado congelado" puede obtenerse a una temperatura en la cual un líquido de una composición especificada se solidifica bajo una presión especificada. El término "estado congelado" se utiliza en este documento para incluir a un estado semi - congelado o completamente congelado.

[0102] En una implementación del invento, las condiciones que retrasan la solubilización de la macromolécula y/o aumentan la solubilización de la enzima lítica comprenden a un nivel de pH en el rango de 7,2-7,3. En otra implementación del invento, las condiciones comprenden una temperatura en el rango de 30-32 °C. En otra implementación del invento, las condiciones comprenden a una concentración de etanol en el rango de 0,2 al 5%. En otra implementación adicional del invento, las condiciones comprenden a un nivel de pH en el rango de 7,2-7,3, una temperatura en el rango de 30-32 °C, y una concentración de etanol en el rango de 0,2 al 5%.

[0103] Alternamente, una mezcla heterogénea puede presentarse al iniciar con una mezcla homogénea que contiene

a la enzima y a la macromolécula y reduciendo selectivamente la solubilidad de la macromolécula en la mezcla.

[0104] La reducción de la solubilidad de la macromolécula en la mezcla puede lograrse, por ejemplo, mediante enfriamientos, ajustes del pH, la adición de solventes tales como la acetona y el etanol, la adición de agentes tales como el glicol de polietileno (PEG - polyethylene glycol) y sustancias polivalentes, la adición de sales anti-caotrópicas tales como el sulfato de amonio y el sulfato de sodio, la adición de sales u otros agentes que causan una carga de sal tales como cloruro de sodio y/o similares.

[0105] En una implementación del invento, la macromolécula es fibrinógeno, la enzima lítica es plasmina y/o plasminógeno, y el inhibidor es un análogo de lisina tal como el ácido tranexámico y el ácido 4-aminometilbíciclo-[2.2.2]-octano-1-carboxílico (EMBOCA).

[0106] En otra implementación del invento, la mezcla biológica es una precipitación proteínica, por ejemplo, un etanol que contiene a una precipitación proteínica. En otra implementación del invento, la mezcla heterogénea se suministra por la suspensión de etanol que contiene (por ejemplo, en la concentración de hasta un 10% de etanol) a una precipitación proteínica que contiene fibrinógeno y plasmin(ógeno) con un solvente. En otra implementación del invento se ejecuta a la suspensión a una baja temperatura (por ejemplo, en el rango de -4 a 20 °C. En otra implementación del invento, la suspensión se ejecuta con una concentración de etanol en el rango de 0.2 al 5%, con un valor de pH bajo (por ejemplo, inferior a 7.3), y a una temperatura de 30-32 °C. En una implementación del invento, bajo estas condiciones, se retrasa selectivamente la solubilización de la macromolécula de fibrinógeno y se aumenta la solubilización del plasmin(ógeno). En una implementación del invento, el solvente es una solución acuosa. La solución acuosa puede contener cloruro de sodio, citrato de tri-sodio deshidratado, albúmina sérica humana, citrato de tri-sodio, glicina, gel de hidróxido de aluminio $Al(OH)_3$. La adición del inhibidor inmovilizado a la mezcla puede ejecutarse en el paso de suspensión al suplementar a la solución acuosa utilizada para suspender a la precipitación con el inhibidor inmovilizado. La solución acuosa utilizada para suspender a la precipitación proteínica puede calentarse previamente (por ejemplo, a una temperatura de 34 °C) antes de su uso. El amortiguador de suspensión puede agregarse a la precipitación con una tasa del 1:4 entre la masa de la precipitación y el volumen del amortiguador de suspensión, respectivamente.

[0107] Tal como se utiliza en este documento, el término "un inhibidor inmovilizado en un portador" se refiere a cualquier modalidad de asociación del inhibidor con una superficie del material del portador. El inhibidor puede adherirse al portador mediante enlaces covalentes, enlaces iónicos, enlaces físicos, enlaces transversales con un reactivo bi-funcional y/o mediante cualquier otro método conocido por aquellas personas con conocimiento en la industria.

[0108] El portador puede tener una superficie hidrofóbica o hidrofílica que interactúe con por lo menos una parte del inhibidor mediante interacciones covalentes hidrofóbicas/hidrofílicas. La superficie hidrofóbica/hidrofílica del portador también podría ser un polímero tal como un plástico o cualquier otro polímero donde los grupos hidrofóbicos/hidrofílicos se han enlazado a elementos tales como el polietileno, el poliestireno o el polivinilo. Alternamente, el inhibidor puede enlazarse covalentemente al portador mediante una molécula o un enlazador que crea una conexión entre el portador y el inhibidor. El término "enlazador" tal como se acaba de utilizar se refiere a un brazo o una correa espaciadora que tiene una masa molecular que varía desde las decenas a los millones de Daltons que es utilizada como un conector intermedio entre el portador y el inhibidor, por ejemplo, el enlazador puede ser una proteína, un péptido y/o un aminoácido. En caso que el portador se enlace directamente con el inhibidor (sin un enlazador), podría utilizarse un grupo reactivo adentro del inhibidor, tal como un grupo hidroxilo, un éster o un grupo amino o un grupo para juntar al grupo reactivo presente en el portador para crear al enlace covalente. El portador también podría tener una superficie cargada o podría modificarse para aportar a un grupo cargado que interactúe con el inhibidor. El portador podría tener a otros grupos reactivos que podrían activarse químicamente para adherirse al inhibidor. Por ejemplo, las matrices activadas por el bromuro de cianógeno, las matrices activadas por epoxi, las matrices activadas por N-hidroxisuccinimida, las matrices activadas por el ácido fosfatídico de di-araquinodilo (DAPA - di-arachidonyl phosphatidic acid), las matrices activadas por diaminodipropilamina (DAPA), las matrices activadas por 1,6 diaminohehexano, las matrices activadas por el ácido succínico, las matrices activadas por 1,3 diamino-2-propanol, las matrices activadas por la etilendiamina (EDA), las matrices activadas por el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, las matrices activadas por piridildisulfuro, las matrices activadas por la yodoacetamida, las matrices activadas por la maleimida, o sus combinaciones. El portador también podría contener a un material inorgánico tal como material de óxido de silicio, por ejemplo, gel de sílice, al cual el inhibidor puede enlazarse covalentemente. El término "portador" tal como se utiliza en este documento incluye a un soporte, o a cualquier material utilizado para adherir, inmovilizar, portar, o estabilizar al inhibidor. Los soportes son bien conocidos en la industria tal como se describe en Hermanson et al. Immobilized Affinity Ligand Techniques (Técnicas de Ligandos con Afinidad Inmovilizada) (Academic Press Inc. 1992). El soporte para ejecutar al método del invento puede ser cualquier material que sea capaz de enlazarse con el inhibidor.

[0109] En una implementación del invento, el soporte/portador es un material cromatográfico. El material cromatográfico puede ser un material hidrofílico tal como la agarosa, la sefarosa, micropartículas acrílicas, la celulosa, vidrio con poros controlados, geles de sílice, dextrano; material hidrofóbico tal como la resina; o un polímero orgánico artificial/sintético tal como materiales que se basan en poliestirenos de poli(acrilamidas). Materiales/polímeros comunes están disponibles comercialmente bajo los nombres comerciales Sephacryl® (Pharmacia, Suecia), Ultragel®

ES 2 599 480 T3

(Biosepara, Francia), TSK-Gel Toyopearl® (Toso Corp., Japón), HEMA (Alltech Ass. (Deer-field, Ill., Estados Unidos de América), Eupergit® (Rohm Pharma, Darmstadt, Alemania). Además, materiales que se basan en azlactonas (3M, St. Paul, Minn., Estados Unidos de América). La agarosa® o la sefarosa® son particularmente preferidas. Estos materiales están disponibles comercialmente de Sigma, St. Louis. En una implementación del invento, el portador es FRACTOGEL® EMD, la matriz polimérica TOYOPEARL®, o TSK-GEL®.

[0110] Los materiales portadores pueden ser sólidos o fluidos. Los soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, matrices, microcircuitos (por ejemplo, microcircuitos de sílice, de sílice-vidrio o de oro), materiales cromatográficos, diapositivas de microscopios, tubos de ensayo, matraces, botellas, discos de micro titulación, soportes de ELISA, superficies de vidrio de plástico, láminas, partículas (por ejemplo, agarosa o sefarosa), micropartículas incluyendo micropartículas magnéticas, geles, polvos, fibras, y similares. En una implementación del invento, el portador es un material cromatográfico que se suspende en un medio apropiado y el material espeso resultante es utilizado en un método de cromatografía de lotes, por ejemplo, utilizando un tubo de ensayo, un matraz, una botella, un receptor de lotes y similares.

[0111] El término "inhibidor de la enzima lítica" se refiere a cualquier agente (incluyendo un agonista) que es capaz de enlazarse (o capturar) a la enzima lítica e interfiere directamente o indirectamente con su actividad lítica en contra de la macromolécula de interés. El inhibidor puede enlazarse al lugar catalítico, al lugar de enlaces de sustratos, al lugar alostérico, o a cualquier otra parte de la enzima lítica. Se puede utilizar un inhibidor competitivo que compite con el enlace de la macromolécula con la enzima lítica. El enlace del inhibidor con la enzima lítica puede ser reversible o irreversible. Los inhibidores pueden ser de un origen natural, de un origen sintético o de un origen natural con modificaciones sintéticas.

[0112] El inhibidor puede ser una molécula pequeña (por ejemplo, un aminoácido tal como la lisina o un análogo de aminoácido tal como el ácido tranexámico y EMBOCA), un polipéptido tal como un anticuerpo específico o sus fragmentos siempre y cuando muestren una especificidad de enlace tal como el anticuerpo completo, un inhibidor de ribonucleasas, un péptido corto o una secuencia péptido mimética. En una implementación del invento, el inhibidor es un análogo de aminoácido tal como un análogo de lisina. En otra implementación del invento, el análogo de lisina es el ácido tranexámico.

[0113] El término "contactar" se refiere a una acción combinatoria que hace que la mezcla heterogénea entre en contacto con el portador y, más particularmente, a una acción combinada que hace que la enzima lítica entre en contacto con el inhibidor inmovilizado en una forma que provoca una interacción de enlace entre el inhibidor y enzima lítica que se encuentra presente la mezcla. La mezcla puede incubarse con el portador durante un período suficiente tiempo que permita el contacto, el enlace y/o la formación de complejos entre el inhibidor inmovilizado y enzima lítica.

[0114] Se descubrió, de acuerdo a este invento, que el contacto de la mezcla heterogénea con el portador que contienen al inhibidor inmovilizado durante un periodo de incubación de 90 minutos resultó en una preparación con niveles incrementados de fibrinógeno funcional en comparación con una preparación obtenida siguiendo un periodo de incubación más corto de 30 minutos. Por lo tanto, la mezcla puede contactarse con el portador que contiene al inhibidor inmovilizado durante un periodo de incubación de más de 30 minutos, por ejemplo, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, y 90 minutos o más.

[0115] Sin atarse a ningún mecanismo, parece que una incubación prolongada permite la captura y remoción subsiguiente de la mayoría de enzimas proteolíticas, obteniendo, por lo tanto, una macromolécula de fibrinógeno no degradada y funcional.

[0116] También se descubrió, de acuerdo a este invento, que cuando el material de inicio está presente en el método del invento en una forma sólida, por ejemplo, en una forma congelada, la reducción de tamaño medio de las partículas del sólido antes del contacto de la mezcla con el inhibidor inmovilizado resultó en una preparación con niveles incrementados de fibrinógeno funcional.

[0117] Sin querer atarse por el mecanismo, parece que la reducción del tamaño medio de las partículas del sólido maximiza el área superficial de contacto del sólido con el portador que contiene al inhibidor inmovilizado durante el paso de contacto lo cual resulta en un enlace rápido y eficiente y en la neutralización de la enzima lítica.

[0118] El tamaño medio de las partículas del sólido puede reducirse mecánicamente, por ejemplo, utilizando una licuadora, cuchillas rotatorias o tamices con cuchillas; manualmente, por ejemplo, utilizando tijeras o al quebrar al sólido con un martillo y/o con un cincel, o mediante cualquier otro método conocido en la industria.

[0119] Se descubrió, sorprendentemente, de acuerdo a este invento, que la reducción del tamaño medio de las partículas de un pellet congelado con un cincel y un martillo (para obtener a partículas de tamaño inferior a 5 cm), seguido por una trituración mecánica (para obtener partículas de 2-8 mm) resultó en una mejor recuperación de fibrinógeno funcional en comparación con la reducción del tamaño medio de las partículas con un cincel y un martillo, seguido por una trituración manual (es decir, cortando el pellet con tijeras).

[0120] Comúnmente, la trituración mecánica es más rápida, produce partículas de tamaño uniforme, y puede iniciarse a una temperatura más baja (en comparación con la trituración manual), minimizando el inicio del proceso lítico, pero, por otro lado, durante el procedimiento en sí se podría producir calor y se lo podría aplicar al material y, por lo tanto, podrían ocurrir daños a la actividad proteínica. En contraste, la trituración manual (por ejemplo, utilizando tijeras) es suave, pero consume tiempo y podría conllevar a la producción de partículas de tamaños variables. Tal como se indicó, la función y recuperación óptima del fibrinógeno se observó utilizando el método de trituración mecánica.

[0121] El término “método de trituración mecánica” se refiere a métodos de desmenuzamiento que utilizan a una máquina que usa una fuente de energía tal como la energía eléctrica o hidráulica. Un “método de trituración manual” se refiere comúnmente a métodos de desmenuzamiento que se basan en la fuerza física del operador, por ejemplo, cortando a las partículas sólidas con tijeras.

[0122] En una implementación del invento, el tamaño medio de las partículas del sólido (por ejemplo, una precipitación) se redujo a alrededor de 2-8 mm antes de que se contacte a la mezcla heterogénea con el inhibidor inmovilizado. En otra implementación del invento, la reducción en el tamaño medio de partículas del sólido se ejecutó mecánicamente.

[0123] En otra implementación adicional del invento, la reducción del tamaño medio de partículas del sólido se ejecutó por medio de una licuadora. En otra implementación del invento, antes de la trituración mecánica, el material sólido (por ejemplo, una precipitación congelada) fue roto/quebrado con un cincel y un martillo, por ejemplo, para obtener un tamaño medio de partículas que sea inferior a 5 cm.

[0124] Se descubrió, de acuerdo al invento, que una vez que la enzima lítica se captura y se neutraliza en el complejo con el inhibidor inmovilizado, la macromolécula está protegida y puede ser solubilizada en una “forma segura”.

[0125] Asimismo, después de que la mezcla heterogénea se contacta con el portador que contiene al inhibidor inmovilizado en lotes, la solubilidad de la macromolécula se incrementa. En un paso subsiguiente, el inhibidor inmovilizado que está en un complejo con la enzima lítica se separa de la mezcla.

[0126] El incrementar la solubilidad de la macromolécula y/o la disolución de las partículas sólidas en la mezcla se puede ejecutar al alterar las condiciones de la mezcla tal como se indicó anteriormente y/o la solubilidad de la macromolécula puede alcanzarse siguiendo un tiempo prolongado de incubación.

[0127] La separación del inhibidor inmovilizado con la enzima lítica enlazada de la mezcla puede ejecutarse mediante centrifugaciones y/o filtraciones. La centrifugación puede ser no continua (por ejemplo, a 17.000 g durante 25 minutos a la temperatura del cuarto) o continua. La centrifugación continua se usa generalmente para procesar a volúmenes industriales de líquidos. Se ejecuta al suministrar continuamente un fluido en un rotor, recolectando el sedimento en el rotor mientras se saca continuamente al sobrenadante mientras el rotor gira. Una centrifugación no continua se refiere, en general, a un proceso de centrifugación en el cual se suministra al líquido en porciones definidas por cada ciclo de centrifugación (“lote”) y el sobrenadante se extrae al final del ciclo de centrifugación después de que se detiene completamente a la centrifugación.

[0128] Generalmente, después del paso de centrifugación, se recauda al sobrenadante dejando a un pelete no deseado con una aglutinación del inhibidor inmovilizado y la enzima lítica capturada.

[0129] En los casos en los que se utiliza a una precipitación de hidróxido de aluminio como el material inicio, la centrifugación alcanza ventajosamente a la remoción de ambos: el aglutinamiento de hidróxido de aluminio y el complejo de enzima lítica-inhibidor inmovilizado todo en un sólo paso.

[0130] Un paso sucesivo de filtración (por ejemplo, a través de filtros 3 y 1-1.2 μm) puede ejecutarse para remover a los montos residuales de inhibidores inmovilizados y de la enzima lítica capturada.

[0131] En caso de que se utilicen micropartículas magnéticas como portadores, la separación puede ejecutarse mediante tecnologías de separación que se basan en micropartículas magnéticas, por ejemplo, tal como se describe en Bjørn-Ivar Haukanes y Catrine Kvam. Application of Magnetic Beads in Bioassays (Aplicación de Micropartículas Magnéticas en Bioensayos). Nature Biotechnology (Biotecnología Natural) 11, 60 - 63 (1993).

[0132] El inhibidor inmovilizado puede reconstituirse y reutilizarse, por ejemplo, al liberar a la enzima lítica enlazada utilizando una concentración alta de sal o al utilizar a una concentración alta de la forma solubilizada del inhibidor y luego separando a la enzima lítica liberada y al inhibidor inmovilizado (por ejemplo, mediante centrifugaciones).

Los materiales biológicos derivados de componentes sanguíneos son purificados comúnmente a partir de partículas inefectivas para minimizar el riesgo potencial presentado por patógenos que se originan en la sangre.

El procedimiento de purificación puede ejecutarse mediante nanofiltraciones, tratamientos con solventes/detergentes, tratamientos

con calor, y radiación gamma o UVC (inferior a 280 nm), o por cualquier otro método conocido en la industria.

El término “partículas inefectivas” se refiere a una partícula microscópica, tal como, pero sin limitarse a, un microorganismo o un prion, que puede afectar o propagarse en un organismo biológico. Las partículas inefectivas pueden ser partículas virales.

El procedimiento de desactivación de las partículas inefectivas puede ejecutarse agregando una molécula a la mezcla antes de, y/o durante, el procedimiento. Las moléculas agregadas y sus productos pueden sacarse mediante gravitaciones, cromatografías de columna, separación de fases o mediante cualquier otro método conocido en la industria. La remoción de partículas inefectivas puede ejecutarse mediante métodos de filtración o de absorción selectiva tales como cromatografías de afinidad, de intercambio iónico o hidrofóbicas. Se puede ejecutar un procedimiento de desactivación viral de varios pasos. Por ejemplo, se puede exponer a la mezcla a un tratamiento de solventes/detergentes, a pasteurizaciones, a cromatografías selectivas y a nanofiltraciones.

[0133] El término “desactivación viral” se refiere a la situación donde virus se mantienen en la mezcla, pero se los vuelve no viables (por ejemplo, mediante la disolución de su recubrimiento de lípidos), y/o a la situación en la cual virus son removidos físicamente de la mezcla (por ejemplo, mediante técnicas de exclusión de tamaño).

[0134] El término “tratamiento de solventes detergentes (S/D)” se refiere comúnmente a un proceso que desactiva a virus envueltos o cubiertos con lípidos al destruir a su envoltura de lípidos. El tratamiento puede ejecutarse mediante la adición de detergentes (tal como Tritón X-45, Tritón X-100 o Tween 80) y solventes [tal como el fosfato de tri(n-butilo), di- o trialkilfosfatos]. La combinación solvente-detergente utilizada para desactivar a virus envueltos en lípidos podría ser cualquier combinación de solvente-detergente conocida en la industria tal como TnBC y Tritón X-100; Tween 80 y colato de sodio y otras combinaciones.

[0135] La concentración utilizada de los solventes y de los detergentes puede incluir aquellas utilizadas comúnmente en la industria, por ejemplo, menos del 0.1% de TnBP menos del 0.1% de Tritón X-100. En otra implementación del invento se utiliza una combinación de 1% de Tritón X-100 y 0.3 por ciento de TnBP. Comúnmente, las condiciones bajo las cuales el solvente-detergente desactiva a los virus consiste de 10-100 mg/mililitro de solvente-detergente con un nivel de pH que varía desde 5-8, y una temperatura que varía desde 2-37 °C durante 30 minutos a 24 horas. Sin embargo, otras combinaciones de solvente-detergente y condiciones adecuadas serán aparentes para cualquier persona con conocimiento en la industria. El aglutinamiento del solvente-detergente utilizado en el tratamiento S/D puede removerse, por ejemplo, utilizando columnas de cromatografía tales como la columna de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC - hydrophobic interaction chromatography column), por ejemplo, material de empaque de sílice C-18 y SDR (remoción de Solventes-Detergentes - Solvent-Detergent removal) HyperD; matrices de absorción proteínica tales como matrices de intercambio de iones; matrices de afinidad; matrices de extracción de aceite y/o de exclusión por tamaño. En otra implementación del invento, SDR HyperD, que es un empaque cromatográfico hecho de micro partículas de sílice en los cuales el volumen de los poros se llena con un polímero acrílico hidrofóbico reticulado tridimensional, se utiliza para remover al solvente-detergente. El SDR HyperD incluye, ventajosamente, una absorción de modalidad mixta de la interacción hidrofóbica y se asocia con un efecto de exclusión molecular [Guerrier L et al. "Specific sorbent to remove solvent-detergent mixtures from virus-inactivated biological fluids" ("Sorbente específico para remover mezclas de solventes-detergentes de fluidos biológicos de virus desactivados"). J Chromatogr B Biomed Appl. 1995 Feb 3;664(1):119-125].

[0136] El término “pasteurización” se refiere comúnmente a un proceso por el cual el calor destruye a virus envueltos en lípidos y no envueltos. El término “pasteurización” es intercambiable con el término “desactivación por medio del calor” o “tratamiento de calor”. La desactivación por calor puede ejecutarse a alrededor de 60 °C durante 10 horas. Estabilizadores tales como la sacarosa y glicina pueden agregarse a la mezcla durante el paso de pasteurización.

El término “nanofiltración” se refiere a un proceso por el cual virus envueltos en lípidos y no envueltos son excluidos de la mezcla, por ejemplo, utilizando filtros de escalas de nanómetros tales como Planova™ 20N, 35N y 75N; Viresolve/70™, Viresolve/180™.

[0137] Los centros pueden tener un tamaño de poros de menos de 70 nm, preferiblemente entre 15 y 50 nm. Sin embargo, cualquier membrana que tenga un tamaño de poros suficiente para reducir o eliminar a virus de la muestra puede utilizarse en la nanofiltración. Los virus removidos por nanofiltraciones pueden envolverse [por ejemplo, el VIH, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, el virus del Nilo occidental, el citomegalovirus (CMV), el virus de Epstein-Barr (EBV - Epstein-Barr virus) el virus del herpes simple], y no envueltos (por ejemplo, el virus de la hepatitis A, el parvovirus B19, el virus del polio).

[0138] La mezcla puede concentrarse mediante procesos de ultrafiltraciones. La ultrafiltración puede seguirse con una diafiltración para intercambiar al amortiguador. La concentración y diálisis mediante ultrafiltraciones y diafiltraciones, respectivamente, puede ejecutarse en un paso o como 2 pasos separados. La diafiltración puede ejecutarse en cualquier solución que sea adecuada para su administración humana.

[0139] En un paso posterior de la purificación, la mezcla es homogénea y, si se desease, puede pasarse a través de, y sujetarse a, una purificación de columna para incrementar la purificación de la enzima crítica residual, por ejemplo, al utilizar a una columna de afinidad empacada con un inhibidor inmovilizado. En el caso de que la enzima lítica sea plasmin(ógeno), la macromolécula de interés es fibrinógeno, y el inhibidor es TEA y/o EMBOCA, se puede utilizar un método cromatográfico descrito en US 7,125,569 y WO02095019.

[0140] A menudo, los materiales de inicio para la purificación de macromoléculas son peletes o precipitaciones tales como la precipitación de hidróxido de aluminio, precipitaciones de etanol, precipitaciones ácidas, precipitaciones de enfriamiento, precipitaciones de glicina y pastas precipitadas de heparina, que comprenden a la macromolécula de interés. Sin embargo, aparte de la macromolécula de interés, estos materiales comprenden un gran monto de enzimas líticas con las cuales aquellas macromoléculas tienen una alta sensibilidad. Comúnmente, antes de la remoción de estas enzimas líticas (por ejemplo, mediante la purificación de cromatografía de columna) se expone al material a un paso de solubilización completa para obtener a una solución homogénea que sea capaz de pasar a través de la columna. Sin embargo, durante o después de la solubilización completa, la macromolécula se vuelve accesible a una degradación por parte de las enzimas líticas hasta cierto punto.

[0141] Ventajosamente, en el método presentado por este invento, las enzimas líticas son capturadas y neutralizadas en etapas tempranas del proceso de purificación o de fabricación cuando la macromolécula está en una forma no soluble o antes de que el material de inicio sea solubilizado completamente. Por ejemplo, un inhibidor inmovilizado de la enzima lítica se agrega a la mezcla heterogénea que contienen a la enzima lítica soluble y a la macromolécula insoluble. Además, el uso en el método de un inhibidor inmovilizado en lotes antes de que el material de inicio se solubilice completamente permite una neutralización rápida de la enzima lítica al inicio del proceso de purificación de las macromoléculas. Este paso de solubilización completa de la macromolécula y la separación (por ejemplo, una centrifugación) permite la remoción de la mayoría de la enzima lítica junto con el aglutinamiento del inhibidor, y permite obtener una preparación de la macromolécula de interés en su forma intacta y no degradada

[0142] En una implementación del invento, la enzima lítica plasmina y/o plasminógeno es removida de una precipitación de hidróxido de aluminio que contiene a la enzima lítica y a macromoléculas de fibrinógeno. En implementaciones como estas, el inhibidor puede ser ácido tranexámico (TEA - tranexamic acid) que es inmovilizado en gel de sefarosa. Los componentes requeridos para el proceso de purificación son agregados en lotes antes de que la precipitación se solubilice completamente o se disuelva completamente. En otra implementación del invento, el procedimiento de purificación se ejecuta de la siguiente forma: se obtiene una precipitación (pellet) congelada de hidróxido de aluminio; se rompe a la precipitación congelada con un martillo y con un cincel hasta obtener partículas con tamaños inferiores a 5 cm; se incuba a las partículas rotas a 4 °C durante aproximadamente una hora (hasta que el material del pellet alcance una temperatura de alrededor de 0 °C); se desmenuza a las partículas utilizando una licuadora durante 2-3 pulsaciones de 15-20 segundos cada una con intervalos de 40 segundos entre las pulsaciones, hasta obtener partículas de unos pocos milímetros, por ejemplo, 2-8 mm; las partículas licuadas son mezcladas con un amortiguador de suspensión calentado previamente (34 °C) con una tasa de 1:4 entre la masa de los pedazos de hielo y el volumen del amortiguador de suspensión (por ejemplo, 7 g de NaCl; 2,95 gramos de citrato de tri-sodio deshidratado; 8 mg/mililitros de albúmina sérica humana; y agua pura a 1 l; pH = 7,4; 6-40 ml de TEA-Sefarosa asentada; y opcionalmente 3:6 g de un 2% de Al(OH)₃; con un pH de 7,4); se agita a la mezcla obtenida durante 90 minutos mientras que se mantiene a la temperatura a 30-32 °C y a un nivel de pH de 7,2; se centrifuga a la mezcla, por ejemplo, en una forma no continua (17.000 g; 25 minutos; temperatura del cuarto) o en una forma continua; se filtra al sobrenadante obtenido a través de un filtro de 3 µm, por ejemplo, a través de un filtro de polipropileno seguido por un filtro de 1-1,2 µm, por ejemplo, fibra de vidrio junto con un filtro; se agregan estabilizadores (por ejemplo, Ca²⁺ y glicina); se ejecutan pasos dobles de desactivación viral, por ejemplo, un tratamiento de solvente/detergente (S/D) seguido por una pasteurización; se ejecuta un paso de ultrafiltración/diafiltración; se expone a la solución obtenida a una purificación de columna utilizando una columna de TEA-Sefarosa, por ejemplo, tal como se presentó en US 7'125.569 y WO02095019; y se obtiene a una composición enriquecida con fibrinógeno.

[0143] Por lo tanto, el invento también permite obtener una preparación enriquecida con la macromolécula de interés en su forma intacta y no degradada y/o una preparación purificada de la macromolécula en su forma intacta y no degradada.

[0144] En una implementación del invento, la macromolécula de interés es fibrinógeno y el término “una preparación enriquecida con fibrinógeno” se refiere a una preparación que comprende a por lo menos 10 mg/mililitro (por ejemplo, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 mg/ml o más) de fibrinógeno funcional.

[0145] El término “preparación purificada de la macromolécula”, tal como se utiliza en este documento, se refiere a una preparación obtenida después de la remoción de por lo menos el 80% (por ejemplo, 80 ± 20%) de la enzima lítica a partir del material de inicio (por ejemplo, una mezcla biológica y/o una mezcla biológica precipitada) que contiene a la enzima lítica y a la macromolécula.

[0146] La concentración de fibrinógeno funcional puede medirse mediante el procedimiento modificado de ensayo de farmacopea europea (0903/1997) tal como se indica en: European Pharmacopoeia (Farmacopea Europea), Fibrin sealant kit (Botiquín sellador de fibrina). 1997; 0903:858; y Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haematol. 1957; 17: 237-246; o mediante cualquier otro método conocido en la industria.

[0147] El invento se basa en los siguientes experimentos y hallazgos que usan un ejemplo del método de acuerdo al invento. Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero no son limitantes.

EJEMPLOS

[0148] En los siguientes experimentos se removió a la enzima proteolítica plasmina y/o plasminógeno [denominado en este documento “plasmin(ógeno)”] de una precipitación congelada de hidróxido de aluminio que contenía la macromolécula de fibrinógeno y la enzima proteolítica de plasmin(ógeno).

Materiales y métodos.

[0149] Preparación de la precipitación de hidróxido de aluminio.

[0150] La precipitación de hidróxido de aluminio (denominado en este documento como “pellet”) es un subproducto obtenido durante el proceso de fabricación del factor VIII (FVIII).

[0151] Generalmente, durante la preparación de FVIII, de fibrinógeno, de fibronectina, del factor XIII junto con proteasas tales como el plasmin(ógeno) se precipitan desde una precipitación criogénica re-suspendida mediante la adición de etanol a una temperatura baja seguido por un paso de centrifugación. Antes del paso de centrifugación, se agrega hidróxido de aluminio a la precipitación criogénica re-suspendida lo cual resulta en la precipitación de factores de coagulación que dependen de la vitamina K tales como el factor II, el factor VII y el factor X con el hidróxido de aluminio durante el paso de centrifugación. La precipitación obtenida de hidróxido de aluminio que contiene fibrinógeno, fibronectina y el factor XIII se separa entonces del sobrenadante que contenía FVIII y se utilizó en los experimentos que se describen más adelante.

[0152] En mayor detalle, la precipitación de hidróxido de aluminio se obtuvo al ejecutar los siguientes pasos: se preparó, esencialmente, a una precipitación criogénica tal como se describió en WO 93/05822 y WO 94/22503. En breve, la precipitación criogénica se preparó a partir de plasma humano congelado (-30 °C) que fue descongelado a 4 °C y se removió al sobrenadante. La precipitación criogénica fue congelada a -30 °C y después se descongeló a 0-4 °C. En el siguiente paso, la precipitación criogénica que se descongeló en un rango de temperatura que variaba desde 10° a 20 °C en un volumen doble de WFI (agua para inyección – wáter for injection) que contenía a 1-3 U/mililitro de sodio de heparina (se agregó heparina como un inhibidor de proteasas). El pH se ajustó a un nivel de 7-8 utilizando ácido acético diluido. Entonces, se agregó un 5% de etanol (para promover la precipitación de fibrinógeno) que contenía de 1 a 3 U/mililitro de sodio de heparina a la mezcla en el mismo volumen de la mezcla (masa/volumen) a una temperatura de 10 a 20 °C. El pH se ajustó a 6,8-7,2 utilizando ácido acético diluido. Se enfrió a la mezcla a una temperatura de 10 °C-15 °C mientras se agitaba y se agregó hidróxido de aluminio (agregado para precipitar a los factores de coagulación que dependen de la vitamina K) a la precipitación criogénica re-suspendida a una concentración final de aproximadamente 0,05%. A este paso le siguió un paso de centrifugación (ejecutado a 17.000 g durante 25 minutos a 14-18 °C). Es sobrenadante (que contenía a FVIII) se removió y se obtuvo al pellet. El pellet contenía entre otras cosas a fibrinógeno, al factor XIII, a fibronectina, a enzimas proteolíticas tales como el plasmin(ógeno), a hidróxido de aluminio y a factores de coagulación que dependen de la vitamina K. El pellet conformado de una alta concentración de etanol (aproximadamente 5% de etanol) y tuvo un nivel de pH inferior a 7,2. El material del pellet fue congelado y se mantuvo a -80 °C hasta los siguientes pasos de procesamiento.

[0153] Concentración del fibrinógeno.

[0154] La concentración de fibrinógeno se midió mediante el método de tiempo de coagulación de Clauss. Este método mide los niveles funcionales de fibrinógeno en una muestra desconocida de acuerdo a su tiempo de coagulación en la presencia de un monto constante de trombina utilizando una máquina que mide el tiempo de coagulación. El tiempo de coagulación que fue medido para la muestra desconocida se compara con aquellos obtenidos con una curva de calibración producida con un estándar de fibrinógeno. El método utilizado es una modificación del ensayo Eu. Ph. 0903/1997 tal como se indicó en: European Pharmacopoeia (Farmacopea Europea), Fibrin sealant kit (Botiquín sellador de fibrina). 1997; 0903: 858; y Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haematol. 1957; 17: 237-246.

Tratamiento de solvente/detergente (S/D).

[0155] Se agregó un 1% (masa/masa) de cada uno de TnBP (Tri-n-butilfosfato) y Triton X-100 (mezcla S/D) a la composición (calentada previamente a 30 °C) mientras se mezclaba (aproximadamente 150 revoluciones por minuto). Se agitó continuamente a la composición durante 4 horas a 30 °C. En el siguiente paso, la mezcla S/D se removió mediante una extracción con aceite de ricino seguido por una cromatografía hidrofóbica de la siguiente forma: la extracción de aceite de ricino se ejecutó con un 5% (masa/masa, concentración final) de aceite de ricino (aceites de Henry Lamotte) al agitar a la mezcla durante 25 minutos a 20 °C seguido por una incubación a 20 °C durante una hora para permitir la separación de las fases. Se formaron 2 fases, una fase acuosa inferior compuesta de fibrinógeno y una fase aceitosa superior compuesta de la mezcla S/D. La fase inferior fue recolectada y filtrada a través de un filtro con una profundidad de 0,8 + 0,45 micrómetros (Sartopore 2 300, Sterile Capsule, Sartorius). La filtración se transfirió a través de una columna C-18 para remover a los vestigios remanentes de S/D.

Pasteurización.

[0156] Se agregó un 180% (masa/masa) de sacarosa y un 11% (masa/masa) de glicina a la solución en calidad de estabilizadores durante el paso de pasteurización. Se agitó lentamente a la composición (50 revoluciones por minuto) durante 10 horas a 58-60 °C.

ES 2 599 480 T3

Composición amortiguadora I

	Componente	Concentración
1	Cloruro de sodio	120 mM
2	Citrato de tri-sodio	10 mM
3	Glicina	120 mM
Valoración a un pH 7.4; se agregaron a los componentes 4-5 antes de su uso		
4	2% de gel de hidróxido de aluminio($\text{Al}(\text{OH})_3$)	0,75 gramos por cada 30 g del pellet
5	Gel* de sefarosa de TEA	10 ml (resina asentada) ** por cada 30 g del pellet
* GE healthcare, número de catálogo 28-4109-03. Se agregó al gel de sefarosa de TEA al amortiguador utilizado para la suspensión de las piezas 2 y 4 exclusivamente (refiérase al procedimiento más adelante). ** “Volumen de la resina asentada”-el volumen de la resina después de que se le permitió precipitarse y después de remover el exceso del amortiguador.		

Composición del amortiguador II

	Componente	Concentración
1	Cloruro de sodio	120 mM
2	Citrato de tri-sodio	10 mM
Valoración a un pH 7,4; se agregaron a los componentes 3-5 antes de su uso		
3	Albúmina sérica humana	8 mg/mililitro
4	2% de gel de hidróxido de aluminio	3,6 g por cada 120 g del pellet
5	*Gel de sefarosa de TEA	10 ml (de resina asentada) ** por cada 120 g del pellet
* Se agregó solamente en un grupo de tratamiento (refiérase al procedimiento más adelante). ** “Volumen de la resina asentada”-el volumen de la resina después de que se le permitió precipitarse y después de remover el exceso del amortiguador.		

Composición del amortiguador III

	Componente	Concentración
1	Cloruro de sodio	120 mM
2	Citrato de tri-sodio	10 mM
3	Cloruro de calcio	1 mM
Valoración a un pH 7,0-7,2		

Ejemplo 1: Remoción del plasmin(ógeno) de un material de una precipitación de hidróxido de aluminio que contiene fibrinógeno

[0157] El material de la precipitación de hidróxido de aluminio que es un subproducto del proceso de purificación de FVIII (descrito en la sección de materiales), contiene un monto grande de fibrinógeno. Por lo tanto, esta precipitación de hidróxido de aluminio puede utilizarse como un material de inicio para la purificación de fibrinógeno. Sin embargo, este material usualmente

ES 2 599 480 T3

contiene altas concentraciones de enzimas proteolíticas, por ejemplo, el plasmin(ógeno) que podrían afectar a la estabilidad de la macromolécula de fibrinógeno.

[0158] La precipitación de hidróxido de aluminio (pellet) fue suministrada en forma de un bloque congelado. La intención del siguiente experimento era la de neutralizar y remover al plasmin(ógeno) lo más pronto posible a partir de este pellet para evitar degradaciones de la macromolécula de fibrinógeno a través de los siguientes pasos de purificación.

[0159] Al inicio del proceso de purificación, es ventajoso el reducir el tamaño medio de las partículas congeladas para maximizar al área de la superficie de contacto del pellet con la solución amortiguadora que será utilizada en un paso subsiguiente. Por lo tanto, el primer método fue el de producir partículas congeladas de 2-8 mm del pellet. Se probaron a 2 métodos diferentes para reducir el tamaño de las partículas: Una trituración manual utilizando tijeras o una trituración mecánica utilizando una licuadora (antes de cada método, se redujo al tamaño de las partículas utilizando un cincel y un martillo).

[0160] Comúnmente, la trituración mecánica es más rápida, produce partículas de tamaños uniformes, y se puede iniciar a temperaturas más bajas (en comparación con la trituración manual)-minimizando el inicio del proceso lítico, pero, por otro lado, durante el procedimiento en sí se podría generar calor el cual sería aplicado al material y, por lo tanto, podrían causarse daños a la actividad proteínica. En contraste, la trituración manual es suave, pero consume tiempo y podría producir a partículas de tamaños variados.

[0161] El siguiente método fue el exponer a las partículas congeladas de 2-8 mm que contenían fibrinógeno a la remoción de plasmin(ógeno). Con este fin, las partículas de hielo fueron expuestas en lotes al ácido tranexámico inmovilizado bajo condiciones específicas que permiten la formación de una mezcla heterogénea. Los siguientes parámetros afectan la solubilidad de las moléculas: la temperatura, el pH y la presencia de solventes orgánicos. Se suspendieron a las partículas congeladas del pellet de 2-8 mm en soluciones diferentes (con o sin el ácido tranexámico inmovilizado) en las cuales se ajustaron estos parámetros para obtener a la mezcla heterogénea.

[0162] Para crear inicialmente a una solubilidad diferencial del plasmin(ógeno) y del fibrinógeno, se suspendieron a las partículas congeladas de 2-8 mm que conforman al pellet de partículas en un amortiguador que contiene al ácido tranexámico congelado (composición del amortiguador I tal como se especificó en la sección de materiales y métodos) con un nivel de pH ajustado a 7,2-7,3, se mantuvo a la temperatura entre 30-32 °C, y se redujo la concentración de etanol a entre alrededor del 5% a alrededor del 1% (como resultado de la adición del amortiguador). Este paso de suspensión se ejecutó mediante una incubación durante 30 o 90 minutos. Después del paso de suspensión, se centrifugó y se filtró a la mezcla para remover al hidróxido de aluminio, el inhibidor inmovilizado, y al plasmin(ógeno) capturado de la mezcla.

[0163] Para examinar si la macromolécula obtenida de fibrinógeno es funcional, se midió la concentración del fibrinógeno mediante el método de tiempo de coagulación de Clauss descrito anteriormente en la sección materiales y métodos.

[0164] El procedimiento de purificación se ejecutó específicamente tal como se menciona a continuación:

1. Se introdujo al material de inicio de la precipitación de hidróxido de aluminio del pellet (preparado tal como se describió en la sección de materiales y métodos) al proceso de purificación en forma de un bloque congelado sólido, a -80 °C. Se removió al pellet congelado del congelador y se rompió con un cincel y con un martillo para obtener 4 pedazos congelados de 30 g cada uno (pedazos más pequeños que 5 cm). Se enviaron a los pedazos congelados a un congelador a -20 °C durante aproximadamente una hora y se les permitió equilibrarse a -20 °C. Entonces, se incubó al material a la temperatura del cuarto (20-25 °C) durante 15 minutos hasta que los pedazos alcanzaron una temperatura de aproximadamente 0 °C.
2. En el siguiente paso, se redujo el tamaño de los 4 pedazos. Los pedazos 1 y 2 fueron triturados/desmenuzados (2 veces durante 20 segundos cada vez con un intervalo de 40 segundos) utilizando una licuadora/o una máquina de trituración a la velocidad más alta (licuadora comercial, modelo 36BL74, Waring Commercial, CO, Estados Unidos de América) y los pedazos 3 y 4 se cortaron con tijeras. En ambos métodos se obtuvieron pedazos de alrededor de 2-8 mm. Este paso fue ejecutado a la temperatura del cuarto.
3. Se suspendieron a cada uno de los 4 pedazos triturados/cortados de hielo del pellet en 120 ml de amortiguador de suspensión pre-calentado (34 °C) (a una tasa de 1:4 entre la masa de los pedazos de hielo y el volumen del amortiguador de suspensión). Se utilizaron a 2 amortiguadores diferentes con (los pedazos 2 y 4) o sin (los pedazos 1 y 3) gel de TEA-Sefarosa (refiérase a los componentes del amortiguador en la sección de materiales y métodos bajo "composición del amortiguador I"). Los pedazos 1 y 3 (sin el gel de TEA-Sefarosa en la composición del amortiguador) se utilizaron como referencia. Se agitaron a las soluciones en un dispositivo agitador magnético durante 10 minutos mientras que se mantuvo a la temperatura entre 30-32 °C.
4. Se ajustó al pH a 7,2-7,3 utilizando 0,1 M de NaOH.
5. Se incubó a la solución mientras se agitaba a 30-32 °C durante 30 minutos (una suspensión durante 30 minutos). Se monitoreo al pH y se ajustó al pH a 7,2-7,3 utilizando 0,1 M de NaOH.

6. La mitad de cada una de las soluciones se transfirió a un nuevo tubo de ensayo y se procesó inmediatamente de acuerdo al procedimiento indicado más adelante (desde el paso 7 en adelante). El resto se incubó durante 60 minutos adicionales (una duración total de la suspensión de 90 minutos incluyendo los 30 minutos que se ejecutaron en el paso 5) mientras se agitaba a 30-32 °C. El pH se monitoreo cada 30 minutos y se ajustó con 0,1 M de NaOH a 7,2-7,3.
7. Las soluciones de todos los 8 tratamientos* fueron centrifugadas a 17.000 g durante 25 minutos a 20 °C y el sobrenadante (que contenían fibrinógeno) se transfirió a un nuevo tubo de ensayo. Este paso fue ejecutado para remover al aglutinamiento del hidróxido de aluminio, el aglutinamiento del gen de sefaroza de TEA y el plasmin(ógeno) capturado.
8. Se filtró el sobrenadante utilizando una bomba peristáltica a través de un filtro pre-humedecido (con el amortiguador de suspensión) MidiCap de 3 µm (Sartorius, Sartopure; número de catálogo PP2 #5595302P7-00-A). Para evitar daños al fibrinógeno durante la filtración, se mantuvo a la presión por ≤0.2 bar ajustando la velocidad de la bomba.
9. Se realizó una filtración adicional utilizando un filtro de fibra de vidrio (GF – glass fiber) MidiCap de 1.2 micrómetros (Sartorius, Sartopure GF+; número de catálogo #5555303P7-00-A). Los 2 pasos de filtración resultaron en una remoción máxima del hidróxido de aluminio, del gel de TEA-Sefarosa y de residuos capturados de enzimas líticas. El primer paso de filtración (a través del filtro de 3 µm) se ejecutó para evitar un bloqueo del filtro de 1,2 micrómetros.
10. Se agregó 0,1 M de CaCl₂ a una concentración final de 1 mM por razones de estabilización.

[0165] Los tratamientos fueron-tratamiento 1: el pellet triturado mecánicamente; tratamiento 2: el pellet triturado mecánicamente y tratado con TEA inmovilizado; tratamiento 3: pellet triturado manualmente; tratamiento 4: pellet triturado manualmente y tratado con TEA inmovilizado. Cada uno de los tratamientos 1-4 se suspendieron y se incubaron durante 30 o 90 minutos.

[0166] La concentración de fibrinógeno se midió en los 8 grupos diferentes en 2 momentos en el tiempo: al final del paso 10 (T0) días después de la incubación a la temperatura del cuarto (20-25 °C; T4). Se midió la concentración de fibrinógeno mediante el método de tiempo de coagulación de Clauss tal como se describió en la sección de materiales y métodos. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: concentración de fibrinógeno en los diferentes tratamientos a los diferentes momentos en el tiempo.

Tratamiento	Duración de la suspensión (minutos)	30		90	
		Concentración de fibrinógeno (miligramo/mililitro)			
	Tiempo de incubación (días)	T0	T4	T0	T4
1	Mecánica (licuadora)	35,3	0	36,8	9,3
2	Mecánica (licuadora) + TEA inmovilizada	40,2	23,0	57,6	27,5
3	Manual (tijeras)	17,3	2,2	42,2	1,6
4	Manual (tijeras) + TEA inmovilizada	25,8	11,9	44,6	25,5
*Ambos métodos mecánico y manual incluyeron un paso previo de reducir manualmente el tamaño medio de las partículas utilizando un cincel y martillo (refiérase al paso 1 del procedimiento de purificación mencionado anteriormente).					

[0167] En los grupos 1 y 3 se observó que cuando se solubilizó el pellet con solamente el amortiguador, el fibrinógeno se degradó casi completamente en T4. Por lo tanto, es crítico neutralizar a las enzimas líticas durante el paso de solubilización.

[0168] Tal como se observó en los grupos 2 y 4, esta degradación se controló mediante la adición de TEA inmovilizado.

[0169] También se observó que la reducción del tamaño medio de las partículas mediante un método mecánico combinado con la adición de TEA inmovilizado dio mejores resultados (tabla 1 tratamiento 2 vs. 4).

[0170] Más específicamente, se observó que el tratamiento 2 (es decir, la reducción mecánica en el tamaño de las partículas y la suspensión de 30 o de 90 minutos en la presencia de un inhibidor inmovilizado) resultó en una concentración incrementada de fibrinógeno en T0 y T4 en comparación con los otros tratamientos (tratamientos 1, 3 y 4). La comparación entre los 2 periodos de suspensión (30 vs. 90) del tratamiento 2 muestra que el período prolongado de suspensión (90 minutos) resultó en una concentración incrementada de fibrinógeno en comparación con el período más corto (30 minutos) en los 2 momentos en el tiempo (27,5 en comparación a 23,0 miligramos/mililitro en T4; y 57,6 en comparación con 40,2 miligramos/mililitro en T0).

[0171] Además, se observó que la adición de un inhibidor inmovilizado en el amortiguador de suspensión resultó en una

ES 2 599 480 T3

concentración incrementada de fibrinógeno en ambos momentos en el tiempo en comparación con el grupo de control sin el inhibidor inmovilizado (comparé el tratamiento 2 con el tratamiento 1, el tratamiento 4 con el tratamiento 3).

[0172] Se descubrió, por lo tanto, que, para obtener a una macromolécula funcional de fibrinógeno, es beneficioso agregar a un inhibidor inmovilizado al amortiguador de suspensión mientras se crea una solubilidad diferencial entre el fibrinógeno y el plasmin(ógeno). Ventajosamente, para incrementar aún más la funcionalidad, las partículas materiales pueden reducirse mediante medios mecánicos, por ejemplo, a un tamaño medio de partículas de 2-8 mm (puede ejecutarse una reducción manual previa en el tamaño medio de las partículas de menos de 5 cm) antes de la suspensión y la suspensión podría ejecutarse durante un periodo prolongado de tiempo (tal como 30 minutos o más).

[0173] En el tratamiento 2 con una incubación de 90 minutos, aproximadamente el 80% del plasmin(ógeno) se removió de la precipitación.

[0174] El siguiente experimento se ejecutó para verificar los resultados previos y examinar el efecto del método utilizado para reducir el tamaño medio de las partículas antes del paso de suspensión (tritución mecánica vs. manual como 2° paso de reducción del tamaño de las partículas) y la duración del paso de suspensión (30 versus 90 minutos) en la funcionalidad de la macromolécula obtenida de fibrinógeno. En este experimento, todos los grupos de tratamiento se suspendieron en la presencia de un inhibidor inmovilizado.

[0175] El procedimiento se ejecutó tal como se indicó en los pasos 1-10 mencionados anteriormente con las siguientes modificaciones:

- 1) Sólo 2 pedazos congelados se obtuvieron en el paso 1, uno se trituró utilizando una licuadora y el otro fue cortado con tijeras; 2) ambos pedazos congelados, se suspendieron en el paso 3 en un amortiguador que incluía a gel de TEA-Sefarosa (se utilizó al amortiguador de suspensión I tal como se listo en la sección de materiales y métodos excepto que sólo se utilizó a 7 ml de resina asentada por cada 30 g del pellet); 3) en el paso 9, se ejecutó la filtración utilizando 1 µm de Ultipor GF+ un filtro (PALL, número de catálogo U010Z047050) en vez de 1,2 micrómetros.

[0176] Se midió la concentración de fibrinógeno de los diferentes grupos en T0 (al final de los procesos) y 3 días después de la incubación a la temperatura del cuarto (20-25 °C; T3). La medición se ejecutó tal como se describió anteriormente.

Tabla 2: Concentración de fibrinógeno con diferentes configuraciones en los diferentes momentos en el tiempo

Tratamiento	Duración de la suspensión (minutos)	30		90	
		Concentración de fibrinógeno (miligramo/mililitro)			
	Tiempo de incubación (días)	T0	T1	T0	T3
1	Mecánica (licuadora)	25,4	19,5	27,9	24,2
2	Manual (tijeras)	21,6	19,0	21,3	7,2

[0177] Los resultados confirman a los resultados previos y muestran que reducir ventajosamente al tamaño medio de las partículas congeladas utilizando un método mecánico (adicionalmente a una reducción manual previa del tamaño medio de partículas utilizando un cincel y un martillo) combinado con una duración prolongada de la suspensión (por ejemplo, 90 minutos) en la presencia de un inhibidor inmovilizado resulta, ventajosamente, en una concentración incrementada de fibrinógeno (refiérase a la concentración de fibrinógeno en T0 y T3 con un periodo de suspensión de 90 minutos del tratamiento 1 en comparación a los grupos paralelos de tratamiento).

[0178] Un experimento de gran escala se ejecutó con 120 g de un pellet congelado. En este experimento, la reducción del tamaño de partículas de todos los grupos de tratamiento se ejecutó mediante medios mecánicos y se ejecutó una suspensión (90 minutos). Este experimento incluyó a 2 grupos de tratamiento: suspendidos con o sin un inhibidor inmovilizado.

[0179] Se ejecutó al experimento en la misma forma que se indicó anteriormente excepto que: (1) Se prepararon a los pedazos congelados de 120 g (refiérase al paso 1 en el procedimiento indicado anteriormente) y se ejecutó la suspensión en el paso 3 en 480 ml de amortiguador calentado previamente (34 °C) tal como se mencionó anteriormente-una tasa de 1:4 entre la masa de los pedazos de hielo y el volumen del amortiguador de suspensión); (2) Se ejecutó una reducción del tamaño de las partículas por medio de una licuadora (tal como se indicó anteriormente en el paso 2); (3) La composición del amortiguador II se utilizó en el paso 3 (para la suspensión) y 8 (para la humidificación de la bomba); (4) Solamente se ejecutó un periodo de suspensión de 90 minutos; (5) Se ejecutó una estabilización (paso 10 mencionado anteriormente) también mediante la adición de glicina a una concentración final de 120 mM (en el procedimiento previo se incluyó glicina en el amortiguador de suspensión, por lo cual no se agrega en el paso de estabilización).

ES 2 599 480 T3

[0180] En este experimento se ejecutaron pasos adicionales de producción (adicionalmente a aquellos mencionados en los pasos 1 a 10) tal como se indica más adelante.

[0181] Los materiales biológicos administrados a humanos deben sujetarse a pasos de desactivación de virus para minimizar el riesgo potencial presentado por patógenos que se originan en la sangre. Por lo tanto, se sujetó a la composición obtenida a 2 pasos de desactivación viral: el tratamiento solvente/detergente (S/D) que desactiva los virus envueltos en lípidos; y la pasteurización por la cual el calor destruye a los virus envueltos en lípidos y los virus que no están envueltos en lípidos (se especifica a ambos tratamientos en la sección de materiales y métodos). En el siguiente paso, la composición viralmente desactivada se diluyó con 2,5 masas (para reducir la viscosidad) del amortiguador (refiérase a la composición del amortiguador III que se indicó anteriormente) y se filtró a través de un filtro de 3 µm (Sartopure PP2, Sartorius) para remover a partículas gruesas. Los estabilizadores (la sacarosa y la glicina que se agregan en el paso de pasteurización) se removieron de la solución mediante ultrafiltraciones/diafiltraciones en contra del amortiguador III usando cintas con un tamaño de poros de 100 K (Pall). La solución homogénea resultante fue sujeta a una purificación de columna utilizando una columna de TEA-Sefarosa (GE healthcare) para remover el plasmin(ógeno) remanente de la solución tal como se describió en EP 1390485. Se concentró entonces a la solución mediante ultrafiltraciones [utilizando cintas de tamaños de poros de 100 K (Pall)] a una concentración de 80-120 mg/mililitro de proteínas totales y formulada con glicina (agregada a una concentración de 120 mM), y clorhidrato de arginina (agregado a una concentración del 2%).

[0182] La concentración de fibrinógeno se midió en grupos diferentes (con o sin inhibidores inmovilizados en el amortiguador de suspensión) en T0 (al final del proceso de producción) y a los 2, 3, 5, 8 y 11 días después de la incubación a la temperatura del cuarto (20-25 °C). Los resultados se muestran en la tabla 3 y en la figura 1.

Tabla 3: Concentraciones de fibrinógeno al pasar del tiempo en muestras tratadas con o sin gel de TEA-Sefarosa durante el paso de suspensión

Tratamiento durante el paso de suspensión	Concentración de fibrinógeno (miligramos/mililitro) **					
	Tiempo de incubación (días)					
	0	2	3	5	8	11
Con TEA-Sefarosa inmovilizada	56	56	*ND	57	53	57
Sin TEA-Sefarosa inmovilizada	47	50	44	38	28	*ND
* ND - Indeterminado (Not Determined)						
** Se examinó una prueba en cada momento del tiempo. Cada muestra se leyó 2 veces.						

[0183] Los resultados concuerdan con los resultados previos y muestran que la adición de un TEA inmovilizado en el paso de suspensión resultó en una concentración incrementada de fibrinógeno en T0 (es decir, una producción incrementada de fibrinógeno) en comparación con tratamientos que no tienen a TEA inmovilizada en el paso de suspensión.

[0184] Adicionalmente, las muestras tratadas con TEA inmovilizado en el paso de suspensión mostraron una estabilidad incrementada en comparación a las muestras que no fueron expuestas a TEA inmovilizado en el paso de suspensión. Por ejemplo, no se observó ninguna reducción sustancial en la concentración de fibrinógeno en el transcurso del tiempo en las muestras tratadas con gel de TEA-Sefarosa inmovilizado durante el paso de suspensión incluso 11 días después de la incubación a la temperatura del cuarto. Mientras que las muestras que no fueron tratadas con el gel de TEA-Sefarosa inmovilizado en el paso de suspensión mostraron aproximadamente una reducción del 40% en la concentración de fibrinógeno después de 8 días.

[0185] La figura 2 muestra un flujograma de pasos de la implementación para la remoción de plasmina y plasminógeno (la enzima lítica) a partir de un material de una precipitación de hidróxido de aluminio que contiene a fibrinógeno (la macromolécula). El ácido tranexámico inmovilizado en gel de Sefarosa se utilizó como un inhibidor y se agregó al amortiguador de suspensión. El material de la precipitación se suministró en una forma congelada. La composición del amortiguador de suspensión utilizado fue de: 480 ml de amortiguador (7 g de NaCl; 2,95 gramos de citrato de tri-sodio deshidratado; 8 mg/mililitro de albúmina sérica humana; y agua pura hasta completar 1 l; pH = 7,4); 6-40 ml de TEA-Sefarosa asentada; y 3,6 gramos de un 2% de Al(OH)₃; con un pH de 7,4.

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para remover una enzima lítica a partir de una mezcla biológica que contiene a la enzima lítica y a una macromolécula de interés que es sensible a la enzima lítica, donde el método comprende los pasos de: facilitar a la mezcla biológica en forma de una mezcla heterogénea que contiene a la enzima lítica, y a la macromolécula, donde por lo menos un 50% de la enzima lítica está disuelta y por lo menos un 50% de la macromolécula está en una forma sólida; facilitar a un inhibidor de la enzima lítica inmovilizado en un portador; contactar a la mezcla heterogénea con el inhibidor inmovilizado en lotes; incrementar la solubilidad de la macromolécula en la mezcla; y separar al inhibidor inmovilizado con la enzima lítica enlazada de la mezcla.
- 10 2. Un método para remover a una enzima lítica de una mezcla biológica precipitada que contiene a la enzima lítica y a una macromolécula de interés que es sensible a la enzima lítica, donde el método comprende los pasos de: facilitar a la mezcla biológica precipitada; facilitar a un inhibidor de la enzima lítica inmovilizada en un portador; disolver parcialmente a la mezcla biológica precipitada con una solución acuosa para obtener a una mezcla heterogénea que contenga a partículas sólidas que contengan a la macromolécula, donde, la mayoría de la enzima lítica está en una forma soluble y la mayoría de la macromolécula está en una forma insoluble; contactar a la mezcla heterogénea con el inhibidor inmovilizado en lotes; disolver las partículas sólidas en la mezcla; y separar al inhibidor inmovilizado con la enzima lítica enlazada de la mezcla.
- 15 3. El método de acuerdo a la reivindicación 1 o a la reivindicación 2, donde la mezcla biológica es, o se deriva de, un fluido corporal seleccionado de un grupo que consiste de semen, esputo, orina, heces, sudor, saliva, mocos nasales, fluido cerebroespinal, y una fracción sanguínea.
- 20 4. El método de acuerdo a la reivindicación 1 o a la reivindicación 2, donde la mezcla biológica es una precipitación proteínica, preferiblemente en la cual la precipitación proteínica es una precipitación criogénica.
- 25 5. El método de acuerdo a la reivindicación 4, donde la precipitación proteínica es un subproducto del proceso de fabricación del factor VIII y se selecciona de un grupo que consiste de precipitaciones ácidas, precipitaciones de enfriamiento, precipitaciones de hidróxido de aluminio, precipitaciones de glicina, precipitaciones de etanol, y pasta precipitada de heparina, preferiblemente donde la precipitación proteínica es una precipitación de hidróxido de aluminio.
- 30 6. El método de acuerdo a la reivindicación 1 o a la reivindicación 2, donde la macromolécula es una proteína.
- 35 7. El método de acuerdo a la reivindicación 1 o a la reivindicación 2, donde la enzima lítica es una proteasa.
8. El método de acuerdo a la reivindicación 1 o a la reivindicación 2, donde el inhibidor es un análogo de aminoácidos.
- 40 9. El método de acuerdo a la reivindicación 1 o a la reivindicación 2, donde la macromolécula es fibrinógeno, la enzima lítica es plasmina y/o plasminógeno, y el inhibidor es un análogo de glicina, preferiblemente donde el análogo de glicina es el ácido tranexámico.
- 45 10. El método de acuerdo a la reivindicación 1, donde la mezcla heterogénea se prepara al facilitar a una precipitación proteínica; y se suspende a la precipitación con una solución acuosa bajo condiciones que retrasan la solubilización de la macromolécula y/o aumentan la solubilización de la enzima lítica, preferiblemente donde las condiciones se seleccionan de un grupo que consiste de un rango de pH de 7,2-7,3, un rango de temperaturas de 30-32 °C, una concentración de etanol en el rango de 0,2 al 5%, y una de sus combinaciones.
- 50 11. El método de acuerdo a la reivindicación 2 o 10, donde la mezcla biológica precipitada se suministra en una forma congelada.
- 55 12. El método de acuerdo a la reivindicación 11, que comprende además el paso de reducir el tamaño medio de las partículas de la mezcla biológica precipitada congelada a alrededor de 2-8 mm, preferiblemente donde la reducción del tamaño medio de las partículas se ejecuta mecánicamente, preferiblemente donde la reducción en el tamaño medio de las partículas se ejecuta utilizando una licuadora.
- 60 13. El método de acuerdo a la reivindicación 1 o a la reivindicación 2, donde el paso de contacto se ejecuta por más de 30 minutos.
- 65 14. El método de acuerdo a la reivindicación 1 o a la reivindicación 2, donde el paso de separación se ejecuta mediante centrifugaciones y/o filtraciones.
15. El método de acuerdo a la reivindicación 2, donde los pasos de disolución parcial de la mezcla biológica precipitada y de contacto de la mezcla heterogénea con el inhibidor inmovilizado se ejecutan simultáneamente, preferiblemente donde las condiciones de disolución parcial se seleccionan de un grupo que consiste de un rango de pH de 7,2-7,3, un rango de temperatura de 30-32 °C, una concentración de etanol en el rango de 0,2 al 5%, y una de sus combinaciones.

16. Un método para purificar a una macromolécula a partir de una mezcla biológica que contiene a la macromolécula y a una enzima lítica específica para la macromolécula, donde el método comprende los pasos de: facilitar a la mezcla biológica en forma de una mezcla heterogénea que contiene a la enzima lítica y a la macromolécula, donde por lo menos el 50% de la enzima lítica está disuelta y por lo menos el 50% de la macromolécula se encuentra en una forma sólida; facilitar a un inhibidor de la enzima lítica inmovilizada en un portador; contactar a la mezcla heterogénea con el inhibidor inmovilizado en lotes; incrementar la solubilidad de la macromolécula en la mezcla; y separar y extraer al inhibidor inmovilizado con la enzima lítica enlazada de la mezcla.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

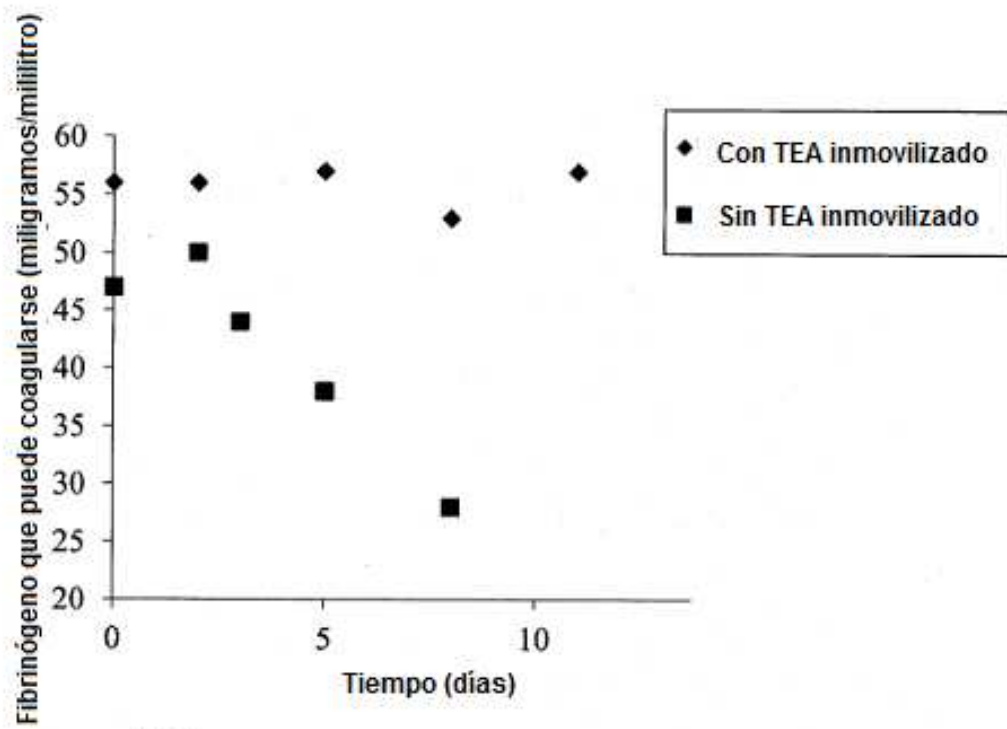


Fig. 1

