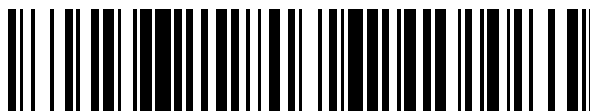


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 683**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/39** (2006.01)

**B01D 15/36** (2006.01)

**C07K 1/18** (2006.01)

**C07K 14/435** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2014 PCT/EP2014/062278**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15188869**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2014 E 14729663 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 3154578**

54 Título: **Métodos de preparación para una generación novedosa de productos de KLH biológicamente seguros usados para el tratamiento contra el cáncer, para el desarrollo de vacunas terapéuticas conjugadas y como agentes de exposición**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.06.2019**

73 Titular/es:  
**BIOSYN ARZNEIMITTEL GMBH (100.0%)  
Schorndorfer Strasse 32  
70734 Fellbach, DE**

72 Inventor/es:  
**KOTTWITZ, ORTWIN;  
STIEFEL, THOMAS y  
MUDDUKRISHNA, SHAMMANA N.**

74 Agente/Representante:  
**MILTENYI , Peter**

ES 2 717 683 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos de preparación para una generación novedosa de productos de KLH biológicamente seguros usados para el tratamiento contra el cáncer, para el desarrollo de vacunas terapéuticas conjugadas y como agentes de exposición.

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere al suministro de sueros de hemolinfa biológicamente seguros, preferiblemente hemocianina, más preferiblemente KLH (hemocianina de lapa californiana).

10 La hemocianina es una proteína de cobre de color azul que se presenta en una forma libremente disuelta en la sangre de numerosos moluscos y artrópodos y transporta oxígeno. De los moluscos, los cefalópodos, quitones, la mayoría de gasterópodos y algunos bivalvos contienen hemocianina. Entre los artrópodos, la hemocianina es típica de arácnidos, xifosuros, malacostráceos y *Scutigera*. Numerosas especies de insectos contienen proteínas que se derivan de hemocianina. Las hemocianinas están presentes en el medio extracelular y flotan en la hemolinfa.

15 Aunque la hemocianina de artrópodos tiene un diámetro máximo de 25 nm bajo un microscopio electrónico y una subunidad tiene un peso molecular de 75.000 Dalton (Da), las cianinas de molusco son mucho más grandes. Por tanto, por ejemplo, la hemocianina de *Megathura* tiene un diámetro de 35 nm y se compone de 2 subunidades. Cada subunidad tiene un peso molecular de aproximadamente 400.000 Da y se divide en ocho dominios de unión a oxígeno, cada uno de los cuales tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000. Los dominios se diferencian de manera inmunológica.

20 La hemocianina de gasterópodos visible bajo un microscopio electrónico tiene un peso molecular de aproximadamente 8 millones de Dalton y es un didecámero. En comparación con esto, la hemocianina de cefalópodos se dispone como un decámero aislado, que también se diferencia significativamente de la hemocianina de gasterópodos en la estructura cuaternaria.

25 Tradicionalmente, la hemocianina se obtiene a partir de la hemolinfa de la *Megathura crenulata*. Más recientemente, el mercado para hemocianinas de gasterópodo se ha expandido para incluir la hemocianina de *Haliotis tuberculata* y *Concholepus concholepus*. La hemolinfa de otros moluscos gasterópodos también está bajo investigación por sus útiles propiedades.

30 La hemocianina de la lapa californiana *Megathura crenulata* es de particular interés inmunológico. La hemocianina, por tanto, también se denomina hemocianina de lapa californiana (KLH). Las hemocianinas son antígenos muy potentes. La inmunización de un vertebrado conduce a una activación no específica del sistema inmunitario que hasta la fecha no se entiende muy bien. Mediante la activación general del sistema inmunitario, entonces es posible también lograr una reacción inmunitaria a otras estructuras foráneas que se han tolerado previamente. Se usa KLH sobre todo como un portador de haptenos con el fin, por tanto, de lograr la formación de anticuerpos contra el hapteno.

35 Además de *Megathura crenulata*, la oreja de mar *Haliotis tuberculata* también pertenece al grupo *Archaeogastropoda*, que es relativamente antiguo en lo que respecta a la evolución. Se sabe que *Haliotis* también produce hemocianina.

40 Se encuentra KLH nativa en la hemolinfa (pH 6,0-8,0) en disolución coloidal como un didecámero (peso molecular: alrededor de 8 millones de Dalton) y como multidecámeros (peso molecular: de 12 a aproximadamente 32 millones de Dalton). La distribución cuantitativa de estos agregados varía. Los didecámeros y multidecámeros de KLH se componen de 2 tipos de subunidades con un peso molecular promedio de alrededor de 400.000 Da. Los dos tipos diferentes de subunidades así como los dos tipos de agregación diferente se deben al hecho de que la KLH nativa es una mezcla de dos tipos diferentes KLH 1 y KLH 2.

45 La KLH es una mezcla de dos hemocianinas diferentes, que se denominan KLH1 y KLH2. La subunidad de KLH1 es un polipéptido de 390 kDa que consiste en ocho dominios globulares denominados 1 a 1 h según su secuencia en la subunidad. Por otro lado, KLH2 tiene un peso molecular de 360 kDa y según los datos más recientes también contiene 8 dominios, denominados 2 a 2 h. *In vivo* cada tipo de subunidad forma homo-oligómeros, mientras que no se han observado hetero-oligómeros.

50 Pueden obtenerse hemocianinas en granjas a partir de animales de prueba. Los métodos descritos para la recogida de hemolinfa implica insertar una aguja en un músculo del pie para penetrar en el seno sanguíneo pedal (Harris *et al.*, "Keyhole Limpet Haemocyanin: Negative Staining in the Presence of Trehalose," *Micron*, 26 (1): 25-33 (1995)). Se establecieron sistemas semiautomatizados que permitían la recogida de grandes cantidades de hemolinfa sin sacrificar los animales. Los procedimientos de fabricación permiten extraer cantidades comerciales de hemocianina de animales criados en un ambiente controlado (documento WO 02/085389, documento US2002/192633).

55 Existe una variedad de métodos bien conocidos para purificar hemocianinas a partir de hemolinfa bruta, que es la fuente biológica de hemocianinas. Estos métodos incluyen centrifugación diferencial, cromatografía de permeación en gel y cromatografía de intercambio iónico (patente estadounidense n.º 5.407.912). Las hemocianinas purificadas

están disponibles comercialmente en muchas formas.

La incorporación de hemocianinas en nuevos productos terapéuticos prometedores (véase por ejemplo, Jurincic-Winkler *et al.*, "Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) Treatment in Patients with Superficial Bladder Carcinoma," *Anticancer Res.*, 16 (4A): 2105-10 (1996); y Biomira, Inc. Company Press Release, Biomira.com, 2001) ha dado como resultado la necesidad de un suministro sostenible de cantidades comerciales de hemocianina producidas en condiciones que cumplan las normas de salud y seguridad impuestas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos y otras agencias reguladoras.

Swerdlow *et al.*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113, 1996, 537-548 dan a conocer la purificación de hemocianina a partir de hemolinfa usando HPLC.

## 10 Breve resumen de la invención

Debido a su origen nativo, hemocianinas tales como KLH, corren el riesgo de contaminación biológica por patógenos tales como componentes sanguíneos patógenos, tales como toxinas, bacterias, incluyendo endotoxinas producidas de ese modo, así como virus.

Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar medios y vías con el fin de minimizar la carga biológica por patógenos en hemocianina nativa. Esto incluye el objeto adicional de proporcionar un procedimiento con el cual pueda prepararse hemocianina segura y altamente pura.

Los presentes inventores han identificado que la sangre y hemolinfa tomadas de moluscos recogidos de manera inmediata del mar pueden estar contaminadas por virus, bacterias, toxinas o endotoxinas. Existe, por tanto, la necesidad de reducir la contaminación en los moluscos y la sangre o hemolinfa obtenidas a partir de los mismos.

De manera convencional, para la eliminación de virus, existen diferentes procedimientos que pueden usarse: inactivación de virus, por ejemplo el tratamiento de la proteína usando el método de detergente/disolvente, radiación ionizada, tratamiento térmico (aproximadamente 60°C) y la incubación a valores de pH < 3. Estos procedimientos no pueden usarse en el tratamiento de hemocianinas tales como KLH porque conducen a una desnaturalización de la proteína. Debido a la elevada estructura molecular de KLH, es extremadamente sensible a estos métodos de inactivación. Además, no pueden usarse otros enfoques tales como nanofiltración de virus que se han desarrollado en los últimos años. Estos filtros no permiten una tasa de eliminación de virus significativa debido a la pequeña diferencia de tamaño entre la contaminación viral y la proteína objetivo. Tampoco es adecuada la filtración en gel que funciona separando el peso molecular para la eliminación de contaminantes virales porque el tamaño del virus no varía significativamente del de las hemocianinas.

Además, un objeto subyacente de la presente invención es proporcionar cantidades terapéuticamente valiosas de hemocianinas, por ejemplo, KLH, o subunidades de la misma, tales como inmunocianina. Estas cantidades necesitan proporcionarse de una manera purificada y aislada. Por consiguiente, se necesitan medios y métodos para aislar y purificar hemocianinas y subunidades de las mismas (por ejemplo, KLH o inmunocianina).

Los presentes inventores han sometido a prueba varios métodos de purificación. Entre estos, la ultracentrifugación está limitada por el manejo debido a las cantidades limitadas de hemocianina que se proporcionan. Además, requiere mucho tiempo y por consiguiente, es costoso. Existe una necesidad de un enfoque de purificación y aislamiento más económico que permita la producción de hemocianina, tal como KLH, o subunidades de hemocianina, tales como inmunocianina. La cromatografía de filtración en gel no fue satisfactoria. Se seleccionó cromatografía de interacción hidrófoba para evaluación adicional, pero resultó ser inadecuada para la purificación y el aislamiento deseados.

La cromatografía de intercambio iónico se basa en interacciones carga-carga entre las proteínas en la muestra y las cargas inmovilizadas en la resina correspondiente. La cromatografía de intercambio catiónico emplea moléculas cargadas positivamente unidas a un soporte sólido cargado negativamente.

Tras llevar a cabo un laborioso programa de investigación, los presentes inventores encontraron que la cromatografía de intercambio aniónico, que emplea moléculas cargadas negativamente unidas a un soporte sólido cargado positivamente, resultaron ser adecuadas para la purificación y el aislamiento deseados. Más preferiblemente, se proporciona el uso de una columna de intercambio aniónico específica que comprende un material específico de matriz (véase la realización 7). En otra realización preferida, se proporciona un método específico para aislar y purificar, por ejemplo KLH, y/o su subunidades, por ejemplo inmunocianina (véanse las realizaciones 1-6).

Realizaciones preferidas de la invención son:

1. Un método de aislamiento y/o purificación de hemocianina o inmunocianina que comprende las etapas de:

a) proporcionar una formulación de hemocianina en el que la formulación de hemocianina es un suero de hemolinfa derivado de un molusco marino;

b) reducir la conductividad de la formulación proporcionada en a) hasta un valor de entre 10 mS/cm y 30 mS/cm añadiendo un tampón de dilución;

c) añadir la formulación diluida de hemocianina obtenida en la etapa b) a una columna de cromatografía de intercambio aniónico;

5 d) lavar la columna con un tampón para purificar la hemocianina, preferiblemente para eliminar sales y otras proteínas; y

e) eluir la hemocianina o inmunocianina de la columna añadiendo un segundo tampón.

2. El método según la realización 1, en el que el tampón para purificar es un tampón en el pH de entre 7 y 8.

10 3. El método de cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que se eluye hemocianina, en el que se usa un tampón de un pH de entre 7 y 8, el cual incluye iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ .

4. El método según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que se eluye inmunocianina, en el que se emplea un tampón de un pH de entre 9 y 10, el cual está libre de iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ .

15 5. El método de cualquiera de las realizaciones 1-4, en el que el material de matriz es una matriz de intercambio aniónico que incluye partículas de un tamaño de partícula de más de 30  $\mu\text{m}$ , preferiblemente más de 40  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente 50  $\mu\text{m}$  +/- 5  $\mu\text{m}$ .

6. El método de cualquiera de las realizaciones 1-5, en el que la matriz de intercambio aniónico incluye poros de un tamaño de poro entre 3.000 y 8.000 Angstrom, preferiblemente de 6.000 – 8.000 Angstrom.

20 7. Uso de la columna de cromatografía de intercambio aniónico que comprende material que tiene un tamaño de partícula de más de 30  $\mu\text{m}$  y un tamaño de poro de entre 3.000 y 8.000 Angstrom para purificar hemocianina o sus subunidades.

Con el fin de optimizar la unión de hemocianina cargada o sus subunidades (KLH o inmunocianina) a la columna de intercambio aniónico, la formulación de proteína (disolución o suspensión) colocada en la columna necesitaba disminuir su conductividad. La selección de cromatografía de intercambio aniónico entre otros métodos de aislamiento y purificación, así como la selección de un material de matriz se describen en el ejemplo 7.

25 Los presentes inventores se enfrentaron con una tarea, que fue la identificación de un material de matriz más preferido. Debido al tamaño de la hemocianina y sus subunidades, un material de matriz con partículas pequeñas resultó no ser útil. Un tamaño de partícula de al menos 30  $\mu\text{m}$  de diámetro resultó ser práctico. En una realización más preferida, el tamaño de partícula es de al menos 45  $\mu\text{m}$  de diámetro, incluso más preferidos son diámetros de 50  $\mu\text{m}$  +/- 5  $\mu\text{m}$ . La capacidad del material de matriz dependió del tamaño de los "poros pasantes" o "poros". Se encontró que un material poroso con poros de al menos 3.000 Angstrom era más preferido. El tamaño de poro puede estar entre 3.000-8.000 Angstrom o preferiblemente entre 6.000-8.000 Angstrom. El material puede ser un material convencional útil para la cromatografía de intercambio iónico en el intervalo de pH de entre 6-10, preferiblemente en el intervalo de entre 7-9. Usando cromatografía de intercambio aniónico con un material de matriz de este tipo se lograron grados de pureza más elevados de más del 90%, preferiblemente del 95% o más preferiblemente del 99%. Se unen a la columna más de 15 mg/ml, preferiblemente más de 17 mg/ml, más preferiblemente más de 23 mg/ml de material de matriz de KLH.

40 Las formulaciones de hemocianina tales como sueros de hemolinfa o subunidades de la misma, tales como inmunocianina, no pueden aplicarse directamente a la columna. Los presentes inventores identificaron que formulaciones de hemocianina típicas, que son sueros de hemolinfa derivados de moluscos marinos contienen, aparte de hemocianina y otros componentes del suero, niveles altos de cloruro de sodio y otros minerales. Esto conduce a una conductividad muy alta en un intervalo de aproximadamente 50 mS/cm. En estas condiciones, la formulación de proteína (el suero de hemolinfa) no puede unirse a la columna de intercambio iónico. Con el fin de lograr una unión cuantitativa de la formulación de proteína, fue necesaria una dilución en tampón. El tampón es un tampón en el intervalo de pH de entre 6 y 8, preferiblemente de entre 7 y 7,5. El tampón incluye preferiblemente iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ . El tampón necesita ser adecuado para diluir los componentes salinos y minerales. En particular, el tampón necesita ser adecuado para disminuir la conductividad. Para lograr una unión cuantitativa de la formulación de hemocianina (o la formulación de proteína en términos más generales), se necesita disminuir la conductividad por debajo de 25 mS/cm, preferiblemente por debajo de 20 mS/cm. Un intervalo preferido es de entre 10 y 20 mS/cm.

50 Un medio preferido es Poros® 50 HQ.

La velocidad de flujo lineal de la muestra puede ser de entre 10 ml/min y 100 ml/min, preferiblemente de entre 30 y 70 ml/min, lo más preferiblemente 50 ml/min.

Tras reducir la conductividad tal como se describió anteriormente, la formulación de proteína (la formulación de

hemocianina) se carga en la columna de intercambio aniónico.

En condiciones de pH neutro (pH de entre 6 y 8, preferiblemente de entre 7 y 7,5), la hemocianina se une a la columna de intercambio aniónico. Se efectúa la elución de otras proteínas, sales, minerales y/u otras moléculas. Preferiblemente, se emplea un tampón tal como se usó para diluir y reducir la conductividad.

- 5 Tras la etapa de lavado, una proteína purificada de una formulación de hemocianina se une a la columna de intercambio aniónico.

Si se desea eluir la hemocianina, tal como KLH, sin disociación, la hemocianina se eluye de la columna usando un tampón de elución en el intervalo neutro (pH de entre 6 y 8, preferiblemente de entre 7 y 7,5). El tampón de elución se aumenta en su concentración iónica en comparación con el tampón de aclarado. En una realización preferida, el tampón de elución comprende iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , más preferiblemente en una concentración de entre 0,01 M y 0,1 M, incluso más preferiblemente de entre 0,05 y 0,01 M, cada uno. En una realización más preferida, el tampón comprende alternativamente o adicionalmente TRIS/HCL, preferiblemente en una concentración de entre 0,1 y 1 M.

La diferencia entre el tampón de aclarado y el de elución puede ser la concentración de sal.

- 15 Normalmente para la elución, se aplica un gradiente de elución que emplea cloruro de sodio desde 0,01 hasta 1 M, más preferiblemente entre 0,05 y 0,7 M, lo más preferiblemente cloruro de sodio entre 0,075 y 0,575 M.

Si se desea disociar la hemocianina en sus subunidades, por ejemplo subunidades de KLH o inmunocianina, antes de eluir, se añade un tampón alcalino (pH de entre 8 y 10, preferiblemente de entre 9 y 10). El tampón de disociación puede ser un tampón de disociación tal como se describe en cualquier otra parte en la memoria descriptiva. Preferiblemente, el tampón de disociación contiene glicina y NaOH. También puede contener NaCl y/o EDTA. En estas condiciones, la hemocianina se disocia en sus subunidades. El tampón de disociación está libre de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  y se usa preferiblemente en una cantidad y concentración para eliminar iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  de la columna. El tampón de disociación también puede usarse para elución. De nuevo, se emplea para eluir un gradiente de elución con concentraciones de sal aumentadas. En la realización preferida, el gradiente de elución es tal como se describió anteriormente para la hemocianina.

- 25 La presente invención ilustra métodos y compuestos y composiciones expuestos a continuación:

Se ilustra un método para la preparación de sueros de hemolinfa a partir de un molusco, comprendiendo el método una etapa de punción del seno sanguíneo pedal del molusco bajo narcosis con frío.

El molusco puede ser *Megathura crenulata*. Otros moluscos son, por ejemplo, *Haliotis tuberculata* (oreja de mar europea), *Haliotis rubra* (oreja de mar australiana).

- 30 Durante la punción, el molusco puede mantenerse en condiciones de cuarentena específicas, en la que los moluscos tras ser obtenidos de sus fuentes naturales se mantienen en un sistema de acuario en cuarentena en condiciones en las que no se suministra alimento orgánico y/o el agua en el sistema de acuario se purifica eliminando contaminantes biológicos. La eliminación de contaminantes biológicos puede incluir biofiltración, espumación de proteínas, etc.

- 35 La sangre obtenida tras la punción puede esterilizarse adicionalmente, preferiblemente usando una filtración por membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ .

La presente invención ilustra un método de aislamiento de hemocianina nativa que comprende proporcionar sueros de hemolinfa, tales como aquellos obtenidos en el método del primer aspecto, y aislar la hemocianina, tal como KLH, a partir de sueros de hemolinfa, preferiblemente empleando cromatografía directa.

- 40 La cromatografía directa puede ser una cromatografía de intercambio iónico.

El método puede incluir además una etapa de disociación de la hemocianina en subunidades del oligómero de hemocianina. Opcionalmente, también se realiza una etapa de purificación de las subunidades de hemocianina. Opcionalmente, se realiza una etapa de reasociación de las subunidades en la forma oligomérica de la hemocianina.

- 45 La purificación de subunidades de hemocianina puede realizarse incluyendo una etapa de nanofiltración con el fin de eliminar la posible contaminación biológica.

La etapa de reasociación puede tener lugar comprendiendo una etapa de diafiltración o una etapa de diálisis.

La hemocianina reasociada puede purificarse finalmente mediante filtración en gel.

La hemocianina puede mezclarse estabilizando un sistema de tampón de estabilización para almacenamiento a largo plazo.

- 50 Se ilustra un método de producción de hemocianina sintética tal como KLH sintética, que comprende una etapa de

disociar la hemocianina, por ejemplo KLH nativa, para obtener subunidades, nanofiltrar las subunidades así obtenidas usando filtros que eliminan virus, preferiblemente nanofiltros con un tamaño de poro de entre 15 y 35 nm, o de entre 20 y 25 nm y reasociar la subunidades obtenidas tras la nanofiltración para obtener hemocianina sintética, por ejemplo la KLH sintética.

- 5 Las subunidades pueden ser inmunocianina. Las subunidades pueden ser menores de 800.000, 500.000, 400.000, 350.000 ó 300.000 Dalton, respectivamente por ejemplo las subunidades están entre 300.000 y 500.000 Dalton.

En la invención, la disociación de hemocianina en subunidades se efectúa aplicando un pH de entre 8 y 10, preferiblemente de 9 y 10. Preferiblemente, la disociación tiene lugar a un pH alcalino de entre 8 y 10, preferiblemente de 9 y 10 con la eliminación de los cationes bivalentes, calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{++}$ ). La eliminación de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  puede efectuarse añadiendo un agente de formación de quelatos, por ejemplo EDTA. En estas condiciones, la KLH nativa se disocia en subunidades. Se ha encontrado que la disociación es reversible, es decir las subunidades pueden reasociarse volviendo a establecer un valor de pH neutro (de entre 6 y 9, preferiblemente de entre 7 y 8) a una mezcla heterogénea de didecámeros y multidecámeros, preferiblemente si se añaden iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ . Una realización más preferida para disociar hemocianina tal como KLH nativa, es la siguiente: la hemocianina se estabiliza en un tampón de estabilización a un pH neutro, que incluye iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , preferiblemente un tampón que incluye TRIS/HCL a un pH de entre 7 y 8. En este tampón, la hemocianina está aún en su forma natural sin desnaturalizar. Se añade un tampón alcalino que está en el intervalo de entre 8 y 10, preferiblemente de 9 y 10. Lo más preferiblemente, la temperatura está por debajo de  $10^{\circ}\text{C}$ , lo más preferiblemente por debajo de  $5^{\circ}\text{C}$ , especialmente entre 2 y  $8^{\circ}\text{C}$ . Los tampones alcalinos preferidos comprenden glicina y NaOH. Otros tampones preferidos comprenden tampón TRIS/HCL pH 8,9, tampón TRIS/HCL pH 8,9 más EDTA, tampón fosfato de sodio pH 8,0, tampón carbonato de amonio pH 8,0, tampón bicarbonato de sodio pH 10,1, tampón bicarbonato de sodio pH 9,5, pueden añadirse NaCl y/o EDTA a los tampones. Las concentraciones de tampón típicas son de 1 - 100 mM, preferiblemente 2 - 50 mM, más preferiblemente 10-20 mM. Si se añade EDTA, se usa en una concentración de 1/10 a 1/2 en comparación con la concentración de tampón. Las mismas concentraciones que para EDTA se contemplan para NaCl, si se añade. El tampón puede incluir EDTA y/o NaCl.

La disolución de subunidades así obtenida (o disolución de inmunocianina) se mantiene al pH alcalino (de entre 8 y 10, preferiblemente de 9 y 10) y puede almacenarse durante más de un mes, más de dos meses, lo más preferiblemente más de tres meses, a una temperatura por debajo de  $10^{\circ}\text{C}$ , más preferiblemente de entre 2 y  $8^{\circ}\text{C}$ .

Las subunidades, por ejemplo inmunocianina, pueden liberarse de una contaminación viral. Se demostró previamente que la nanofiltración elimina de manera eficaz diversos virus de las disoluciones de proteína. Sin embargo, los presentes inventores encontraron que debido al enorme tamaño y comportamiento de agregación de los isómeros de KLH, no puede aplicarse nanofiltración para la KLH en su forma nativa. El desplazamiento del peso molecular de KLH nativa desde más de 8 millones de Dalton hasta un peso molecular de menos de 500.000 Dalton, normalmente hasta un peso molecular uniforme de aproximadamente 400.000 Dalton de las subunidades de KLH (inmunocianina), sin embargo, creó la base para la eliminación de virus realizada por los presentes inventores. Las nanofiltraciones pueden realizarse con nanofiltros disponibles comercialmente. Normalmente, estos filtros tienen un tamaño de poro de 15-35 nm, más preferiblemente de entre 20-25 nm. Filtros de este tipo están disponibles comercialmente como cápsulas de filtro, por ejemplo cápsulas de filtro Planova. Nanofiltros de este tipo pueden ser una unidad de un solo uso. Los nanofiltros pueden utilizar una membrana microporosa de fibra hueca de baja unión a proteínas construida de celulosa regenerada de cupramonio hidrófila de manera natural con una distribución de poros estrecha. Puede aplicarse un amplio intervalo de áreas de superficie eficaces de entre  $0,001\text{ m}^2$  hasta  $4\text{ m}^2$ , preferiblemente de entre  $0,01\text{ m}^2$  y  $0,3\text{ m}^2$ .

El filtrado obtenido puede usarse con fines terapéuticos (preparaciones de inmunocianina). Por consiguiente, se ilustra un método de producción de inmunocianina que comprende las etapas de disociar hemocianina nativa para obtener subunidades y nanofiltrar las subunidades así obtenidas a través de un filtro con un tamaño de poro de entre 15 y 35 nm. La filtración puede ser una filtración de flujo cruzado. Más preferiblemente, la cantidad de una proteína obtenida es más del 60%, más del 70%, preferiblemente más del 80%, más preferiblemente más del 90%, lo más preferiblemente más del 93% de inmunocianina o subunidades de hemocianina.

La inmunocianina o las subunidades de hemocianina pueden reasociarse tras la nanofiltración para obtener una hemocianina "sintética", preferiblemente KLH "sintética". La reasociación se efectúa restableciendo un valor de pH neutro. La suspensión de proteínas o disolución de proteínas se reasocia a una mezcla heterogénea de didecámeros o multidecámeros desplazando el pH hasta el intervalo de entre 6 y 9, preferiblemente de entre 7 y 8. La reasociación puede efectuarse añadiendo iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ . La cantidad de iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  puede ser menor de 0,5 M, cada uno. Pueden emplearse tampones tales como tampón de TRIS/HCL 0,05 - 0,1 M pH 7,4, opcionalmente junto con  $\text{MgCl}_2$  entre 0,05 M y 0,2 M, y/o  $\text{CaCl}_2$  entre 0,05 M y 0,2 M, y/o NaCl entre 0,15 M y 0,3 M. Otros tampones son glicina/NaOH pH 7,4, o fosfato de sodio, pH 7,4.

Por consiguiente, la presente invención ilustra un método de producción de KLH sintética o hemocianina sintética que comprende las etapas de disociar KLH nativa para obtener subunidades, nanofiltrar la subunidades así obtenidas usando filtros con un tamaño de poro de entre 15 y 35 nm y reasociar la subunidades obtenidas tras la nanofiltración para obtener la hemocianina sintética o KLH sintética. La filtración puede ser una filtración de flujo

cruzado, más preferiblemente una filtración de flujo cruzado tal como se describió anteriormente. Normalmente, la cantidad de proteína obtenida es más del 60% por cantidad de KLH nativa. La (KLH sintética o hemocianina sintética) obtenida es normalmente más del 70%, más preferiblemente más del 80%, lo más preferiblemente más del 90% o del 93% por cantidad de KLH nativa.

## 5 Detalles de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones 1 y 7.

En un primer aspecto preferido de la invención, tal como se reivindica, se proporciona un método para la preparación de sueros de hemolinfa de bajo contenido en endotoxinas/baja carga biológica a partir de moluscos tales como *Megathura crenulata* en cantidades comerciales.

10 En una realización, la presente invención, tal como se reivindica, se refiere al método de preparación de un material de partida de calidad farmacéutica derivado de moluscos, preferiblemente de lapas californianas. La calidad de bajo contenido en endotoxinas/baja carga biológica de sueros de hemolinfa se logra aplicando un procedimiento de cuarentena específico a las lapas de fuentes naturales o de acuicultura. El diseño interno del sistema de acuario en cuarentena conduce a una reducción significativa de la contaminación biológica es decir bacterias, endotoxinas y virus.

15 Un punto clave de este primer aspecto de la invención es el tratamiento de moluscos en un sistema de acuario en cuarentena. Los animales se mantienen en condiciones de temperatura específica y/o los acuarios en cuarentena incluyen medios para la eliminación de proteínas tal como un espumador de proteínas centrífugo y/o uno o más biofiltros.

20 Preferiblemente, se usa agua de mar artificial en el acuario y más preferiblemente, se emplea una circulación rápida de agua de mar artificial para tratar los moluscos. La corriente en el acuario puede imitar una zona de surf en el mar. Los contaminantes biológicos se eliminan mediante espumación extensiva y/o biofiltración del agua de cuarentena.

25 El sistema de acuario del primer aspecto conduce a la reducción de los contaminantes biológicos. Elimina excrementos de manera eficaz y de ese modo conduce a la eliminación de bacterias y endotoxinas bacterianas. Durante el tratamiento en el acuario, los animales no se alimentan preferiblemente, lo cual de nuevo minimiza el contenido en componentes orgánicos y conduce a una reducción de la contaminación.

La conductividad, el valor de pH y el potencial redox del agua de mar se controlan y se miden preferiblemente de manera permanente.

30 La temperatura del agua en el medio natural de las lapas californianas es de entre 10 y 20°C, preferiblemente de entre 12 - 16°C; por tanto se necesita enfriar el agua en el acuario. Con este fin, puede colocarse un intercambiador de calor en el reservorio. La temperatura del agua se monitoriza mediante sensores de temperatura en la cubeta, que controlan las unidades de enfriamiento para el objetivo de temperatura establecido (14°C ± 2°C).

35 El agua en el acuario es preferiblemente agua de mar artificial, es decir agua que tiene una conductividad y un pH controlados, y preferiblemente potencial redox y más preferiblemente contenido en sal de adición para parecerse al agua de mar. Por ejemplo, el valor de conductividad es de entre 46-52 mS/cm y el pH de entre 7,5-8,5. En una realización, la densidad puede oscilar entre 1,020 y 1,030. Se prefiere un potencial redox >100.

La liberación de los animales para la punción necesita uno, preferiblemente dos, más preferiblemente tres, más preferiblemente cuatro, más preferiblemente cinco, más preferiblemente seis, más preferiblemente siete días, más preferiblemente 10 días, lo más preferiblemente 13 días de mantenimiento de los animales en el acuario.

40 El procedimiento de cuarentena de animales interno de la invención ayuda a reducir la carga biológica. Por ejemplo el contenido en coliformes del animal puede reducirse tras cultivo en condiciones de cuarentena.

Tras la cuarentena, los animales se puncionan en su seno sanguíneo pedal bajo narcosis con frío.

45 Un segundo punto clave del primer aspecto de la presente invención, por consiguiente, es el procedimiento para la punción de los moluscos. Antes de la punción ("extracción de hemolinfa"), los moluscos se retiran del acuario, pueden examinarse visualmente, se lavan preferiblemente y se transfieren a una instalación de sala limpia.

Los animales se transfieren preferiblemente a una instalación de sala limpia, donde los animales se lavan usando una disolución isotónica de hemolinfa (HIS), una disolución de cloruro de sodio interna cuya concentración de sal es isotónica con los sueros animales.

Los animales se pesan, y se depositan sobre estantes de soportes de punción preestablecidos.

50 Durante esta operación se tiene cuidado preferiblemente de no provocar lesiones internas, especialmente al sistema intestinal, por dos razones: en primer lugar, para evitar la contaminación del producto con materia fecal y en segundo lugar, para evitar la muerte del animal. Si aparece una lesión accidental del tracto intestinal, tal como

indican los sueros de hemolinfa contaminados por materia fecal, se descarta el material.

5 Tras desinfectar, puede realizarse una punción en la tercera extremidad de la base del pie con una jeringa que comprende una cánula lumbar. Puede insertarse una entrada de la cánula en el músculo del pie y puede empujarse hacia delante hasta que se alcanza el seno pedal. Ni el seno bucal ni el seno cardíaco se puncionan preferiblemente.

En una realización, tras completarse la extracción de sangre, se inyecta disolución isotónica estéril, preferiblemente a través de la cánula, y el líquido que sale se examina para determinar si se ha alcanzado el seno sanguíneo, lo que se manifiesta mediante un fluido azul.

10 En una realización preferida de la presente invención, se recogen de 10 a 60 ml, más preferiblemente de 30 - 50 ml o del 10 - 20 %, preferiblemente del 12- 15% del peso corporal del animal, de hemolinfa en un tubo de centrifuga estéril.

En una realización, la hemolinfa que se ha retirado se reemplaza con disolución HIS.

La hemolinfa se enfría preferiblemente entre 2 y 8°C y puede agruparse.

15 Se vuelven a transferir los animales preferiblemente, se lavan y se devuelven a los tanques de acuarios de recuperación internos. Los animales pueden monitorizarse durante de 1 a 4 días y se devuelven a su medio natural. Este método permite devolver los moluscos al océano vivos.

Según un tercer punto clave del primer aspecto, la sangre obtenida puede purificarse y esterilizarse mediante filtración por membrana de 0,2 µm.

20 Antes de agrupar, las fracciones de hemolinfa deben demostrar que se corresponden con las especificaciones del IPC (control en proceso) realizado en las muestras individuales. Se agrupan las fracciones de hemolinfa frías en una botella desechable estéril y se mezclan bien, mientras se evita la formación de espuma.

En un segundo aspecto de la invención, tal como se reivindica, se proporciona un método para la preparación de subunidades de hemocianina o hemocianina de baja carga biológica/bajo contenido en endotoxinas a partir de moluscos tales como *Megathura crenulata* en cantidades comerciales.

25 Preferiblemente, el método puede proporcionar hemocianina estandarizada molecular libre de virus, biológicamente segura, por ejemplo KLH, o subunidades de hemocianina, por ejemplo subunidades de KLH en cantidades comerciales.

El método comprende el aislamiento de hemocianina a partir de sueros de hemolinfa, mediante cromatografía directa, tal como se expone en la reivindicación 1.

30 El método comprende preferiblemente una etapa de disociación de hemocianina en las subunidades de hemocianina.

El método también puede comprender una etapa de purificación de subunidades de hemocianina.

El método también puede comprender una etapa de nanofiltración. En esta etapa pueden separarse virus de las subunidades de hemocianina, es decir la etapa se realiza con el fin de eliminar la posible contaminación virológica.

35 El método también puede comprender una etapa de reasociación de la hemocianina a partir de las subunidades.

Los sueros de hemolinfa contienen, basándose en su origen a partir de un molusco marino, aparte de hemocianina y otros componentes del suero, niveles altos de cloruro de sodio y otros minerales. La conductividad de sueros de hemolinfa es, basándose en su alto contenido en sal, en promedio alrededor de 50 mS/cm. Para lograr la unión cuantitativa de hemocianina, por ejemplo de KLH, la conductividad se debe reducir hasta < 20 mS/cm.

40 Con el fin de reducir la conductividad tal como se describió anteriormente, los sueros de hemolinfa pueden desalarse de manera parcial mediante métodos adecuados tales como filtración en gel, electrodiálisis, diafiltración o dilución. La eliminación de sales conduce a la precipitación de los otros componentes del suero, es decir proteínas e hidratos de carbono. El precipitado puede eliminarse mediante centrifugación a baja velocidad, filtración profunda o filtración por membrana (0,8 u. 0,45 µm).

45 Posteriormente, la KLH de alto peso molecular disuelta coloidal puede aislarse mediante procedimientos de cromatografía es decir cromatografía de intercambio iónico, que puede estar seguida luego por disociación y purificación de subunidades.

Son posibles dos métodos preferidos de disociación de hemocianina nativa tal como KLH,; disociación *in situ* en una columna de captura de intercambio iónico o disociación mediante diafiltración.



Las subunidades de hemocianina obtenidas pueden purificarse mediante una etapa de cromatografía de intercambio iónico adicional y finalmente pulirse mediante filtración en gel.

5 La proteína hemocianina unida a oxígeno nativa en una realización se purifica a partir de la hemolinfa mediante cromatografía de intercambio iónico. La hemocianina va a unirse a un intercambiador aniónico y luego va a disociarse en la columna en las subunidades de KLH (inmunocianina) en tampón alcalino (pH de 7 a 10, preferiblemente de 8,6 a 9,6). Se recupera la inmunocianina de la columna por medio de elución en gradiente de sal. La disolución resultante de inmunocianina puede desalarse y concentrarse mediante diafiltración/ultrafiltración. La disolución concentrada de inmunocianina puede purificarse posteriormente mediante una etapa de cromatografía de intercambio iónico adicional.

10 En otra realización, se purifica la proteína hemocianina unida a oxígeno nativa a partir de la hemolinfa mediante cromatografía de intercambio iónico. Se une la hemocianina a un intercambiador aniónico y luego se recupera de la columna por medio de elución en gradiente de sal. Se desala la disolución de hemocianina resultante, se concentra y se disocia en las subunidades de KLH (inmunocianina) por medio de diafiltración, diálisis o ultrafiltración en tampón alcalino (pH de 7 a 10, preferiblemente de 8,6 a 9,6). Finalmente, la disolución de inmunocianina puede concentrarse, seguido por una etapa de cromatografía de intercambio iónico adicional.

15 En otra realización, se purifica la proteína hemocianina unida a oxígeno nativa a partir de la hemolinfa mediante cromatografía de intercambio iónico. Se une la hemocianina a un intercambiador aniónico y luego se recupera de la columna por medio de elución en gradiente de sal. Se aísla la hemocianina de la disolución de hemocianina resultante por medio de ultracentrifugación.

20 Posteriormente, se disuelven los sedimentos de hemocianina resultantes y se disocian en las subunidades de KLH (inmunocianina) en tampón alcalino (pH de 7 a 10, preferiblemente de 8,6 a 9,6). Finalmente, la disolución de inmunocianina puede concentrarse seguido por una etapa de cromatografía de intercambio iónico adicional.

25 Con el fin de lograr la disociación de hemocianina, en general, la hemocianina puede disolverse en tampón de disociación (pH de 8 a 10, preferiblemente de 8,6 a 9,6, preferiblemente exento de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ ). Esto crea condiciones alcalinas, que conducen a la disociación de la molécula de hemocianina nativa en sus subunidades.

30 La disolución de inmunocianina puede concentrarse. Antes de una purificación final (pulido), por ejemplo mediante filtración en gel, la disolución de inmunocianina puede concentrarse hasta un contenido en proteína de 20 mg/ml ( $\pm 2,5$  mg/ml), por ejemplo mediante ultrafiltración. Con este fin, se usan preferiblemente membranas de poliéter sulfona o de polisulfona de baja unión a proteína (límite de separación: 30.000 Dalton; área de filtro:  $\geq 700$  cm<sup>2</sup>) montadas en una unidad de ultrafiltración de acero inoxidable. Tras la ultrafiltración, se filtra la disolución de inmunocianina concentrada, por ejemplo a través de un filtro de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ .

La disolución de inmunocianina concentrada puede entonces purificarse, por ejemplo mediante cromatografía líquida de presión media a través de una columna de filtración en gel.

35 Una columna preferida es Superose® 6 (calidad preparativa; compuesta de perlas de agarosa porosa de alta reticulación); tamaño de perla 20-40  $\mu\text{m}$ , intervalo de fraccionamiento 5.000-5.000.000 Da. Como eluyente puede usarse un tampón de elución (pH 8-10, exento de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ ). La disolución de inmunocianina concentrada puede cargarse en la columna en condiciones asépticas. El pico de inmunocianina principal se recoge a un peso molecular de 400.000. Se enfría preferiblemente la fracción de inmunocianina de manera inmediata hasta +2-8°C y se filtra, por ejemplo a través de un filtro de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ .

40 Debido al origen de las hemocianinas nativas tales como KLH existe un riesgo virológico por patógenos humanos. Para garantizar la seguridad biológica, el procedimiento posterior de compuestos biológicos contiene preferiblemente etapas para la inactivación o eliminación de posible contaminación por virus. Los métodos de inactivación disponibles se sometieron a prueba en KLH y se encontró que no eran adecuados para las hemocianinas debido a su efecto perjudicial en las preparaciones de KLH.

45 Según la presente invención, puede usarse nanofiltración para obtener subunidades de hemocianina purificadas, por ejemplo subunidades de KLH, es decir para la eliminación de posible contaminación por virus.

50 En esta etapa, puede seleccionarse una adecuada membrana de filtro de virus, que no influye en el contenido y las características bioquímicas, químicas y físicas de subunidades de hemocianina, por ejemplo subunidades de KLH. Se comparan subunidades de hemocianina filtradas y no filtradas en un estudio de comparabilidad con el fin de demostrar que las subunidades están funcionalmente intactas. Puede realizarse un estudio de validación de virus para mostrar el efecto de filtración de virus de subunidades de hemocianina en la eliminación de un virus modelo con diferentes tamaños.

55 Con el fin de demostrar la seguridad de proteínas farmacéuticas derivadas de fuentes biológicas es obligatorio para el fabricante de dichos productos demostrar la inactivación y/o eliminación eficaz de virus patógenos durante el procedimiento de fabricación. Habitualmente, esto se realiza mediante adición conocida deliberada de una versión a menor escala del procedimiento de fabricación con virus modelo y/o relevantes.

5 Puede realizarse la eliminación de al menos virus de leucemia murina, virus de la pseudorrabia, reovirus tipo 3 y parvovirus porcino mediante nanofiltración. Con el fin de someter a prueba la eliminación, se enriquecerá una muestra de prueba con el virus en títulos definidos y después se someterá a nanofiltración. Pueden retirarse las muestras a partir de la muestra de prueba prefiltrada, con adiciones conocidas así como del nanofiltrado y monitorizarse para determinar virus mediante titulación de punto final y mediante análisis volumétrico, respectivamente.

La eliminación de virus se realiza preferiblemente con el fin de reducir el título de virus al 50%, preferiblemente al 60%, más preferiblemente al 70%, más preferiblemente al 80, más preferiblemente al 90, más preferiblemente al 99%, lo más preferiblemente al 99,9%.

10 Virus relevantes que representan posibles contaminantes de productos de hemocianina son los siguientes:

Virus modelo	Taxonomía	Genoma	Estructura	Tamaño/nm	Estabilidad	Línea celular indicadora
Virus de la hepatitis A (VHA)	<i>Picornaviridae</i>	ARNmc	sin envuelta	25-30	de media a alta	FRhK-4
Virus de la diarrea vírica bovina (VDVB)	<i>Flavivirus</i>	ARNmc	con envuelta	40-60	baja	MDBK
Parvovirus porcino (PVP)	<i>Parvoviridae</i>	ADNmc	sin envuelta	18-24	muy alta	PK13
Virus de simio 40 (VS40)	<i>Papovaviridae</i>	ADNbc	sin envuelta	40-50	alta	Vero

15 Virus de la hepatitis A (VHA) - virus de ARN monocatenario pequeño (25-30 nm) no envuelto (ATCC VR-1402) con una resistencia de media a alta a la inactivación fisicoquímica. La hepatitis A pertenece a la familia *Picornaviridae*, la cual también incluye VEMC y poliovirus. Este virus es un posible contaminante de la sangre y el plasma humanos y por tanto debe usarse cuando sea posible en los estudios. Sin embargo, la presencia de anticuerpos neutralizantes para este virus en productos sanguíneos y plasmáticos significa que su uso se limita a situaciones en las que no se produzca este problema.

20 Parvovirus porcino (PVP) – virus de ADN monocatenario pequeño (~18-25 nm) no envuelto (proporcionado por Octapharma AG, Frankfurt, Alemania) con una alta resistencia a la inactivación fisicoquímica. Por tanto, proporciona una prueba rigurosa para la capacidad de reducción y el aclaramiento del sistema de procedimiento anterior. El virus parvovirus humano B19 puede estar presente en títulos altos en plasma humano, y por tanto puede usarse PVP como un modelo para B19 en la validación de productos derivados de plasma humano. Se han reportado incidencias de contaminación de productos recombinantes con parvovirus tales como virus minuto murino y puede usarse PVP como modelo para esta clase de virus.

25 Virus de la diarrea vírica bovina (VDVB) – virus de ARN monocatenario de tamaño medio (~40-60 nm) envuelto (ATCC VR-534) con una resistencia media a la inactivación fisicoquímica. VDVB pertenece a la familia *Flaviviridae* la cual también contiene los virus de la hepatitis C y hepatitis G. VDVB es por tanto un virus modelo adecuado, cuando interesan la hepatitis C o G, particularmente en un producto derivado de sangre humana, y también para otros contaminantes de *Flavivirus* y *Togavirus*, por ejemplo cuando se usa material derivado de bovinos.

30 Virus de simio 40 (SV40) – virus de ADN bicatenario pequeño (~40 nm) no envuelto (ATCC VR-305) con alta resistencia a la inactivación fisicoquímica. El VS40 proporciona una prueba rigurosa del procedimiento posterior y su capacidad para eliminar/inactivar virus. Este virus actúa como un modelo para otros virus sin envuelta resistentes que pueden estar presentes como contaminantes en el material de partida, y es un modelo para contaminantes de virus del papiloma y polioma.

35 Normalmente, se eliminan al menos VHA, VDVB y VS40, por ejemplo con un LRF de más de 2, 3, 4, 5 ó 6 por cada virus. El PVP puede eliminarse con un LRF de más de 2, 3 ó 4. Alternativamente, o además, también se eliminan los siguientes virus de la hemocianina o inmunocianina de la presente invención: virus de leucemia murina (MuLV), virus de la pseudorrabia (PRV) y reovirus tipo III (Reo III). Estos virus también se eliminan con unos LRF de al menos 2 ó 3 por cada virus.

40 La estabilización de subunidades de hemocianina con virus filtrados puede realizarse por medio de liofilización. Las disoluciones de proteínas (especialmente proteínas de alto peso molecular) en general no son estables a largo plazo. Durante el almacenamiento, se produce precipitación de proteínas junto con pérdida de actividad. El almacenamiento en sistemas de tampón de estabilización o en disoluciones aplicables para uso farmacéutico en condiciones refrigeradas no conduce a preparaciones de KLH que satisfagan la estabilidad requerida para productos farmacéuticos (2 - 3 años). La liofilización de proteínas de alto peso molecular con retención de su actividad biológica completa sólo es posible con una mezcla adecuada de excipientes. Según la presente invención, pueden

usarse estabilizadores de proteínas, por ejemplo lactosa, manitol, sacarosa, etc. Estos estabilizadores pueden añadirse a la disolución de inmunocianina purificada como disoluciones con concentraciones de 100 – 700 mg/ml y con un volumen de 0,1 ml a 1,0 ml por 1 mg de cada proteína.

5 Las subunidades de KLH liofilizadas se prueban para determinar su actividad biológica completa y su integridad molecular.

10 La estabilización de subunidades de hemocianina con virus filtrados también puede realizarse por medio de desalación. La desalación mediante diafiltración con agua para inyección conduce a una disolución en agua de subunidades de hemocianina altamente concentrada (20 mg/ml) libre de sales con una estabilidad a largo plazo inesperada en condiciones refrigeradas (1 - 2 años). La disolución de subunidades de hemocianina libre de sal es el portador ideal para la fabricación de vacunas conjugadas.

Los medios y métodos para la desalación son conocidos por los expertos en la técnica. Normalmente la desalación se realiza siempre que la conductividad del filtrado en un procedimiento de filtración iterativo sea  $\geq 10 \mu\text{S/cm}$  o la conductividad del retenido sea  $\geq 150 \mu\text{S/cm}$ .

15 Las subunidades de hemocianina libres de sal se prueban para determinar su actividad biológica completa y su integridad molecular.

Pueden usarse subunidades de hemocianina como mezcla en la razón presente en la hemocianina nativa (“inmunocianina”) o pueden separarse subunidades individuales y usarse tras el aislamiento.

Con el fin de obtener hemocianina “sintética”, tiene que realizarse la reasociación de las subunidades, es decir el replegamiento de subunidades de KLH filtradas de virus.

20 El tamaño de los oligómeros de hemocianina, por ejemplo de didecámeros de KLH (aproximadamente 35 nm), se sitúa en el mismo tamaño que los virus grandes. Los métodos de aislamiento y purificación descritos (cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel) para la KLH nativa no conducen a los factores de reducción requeridos de posible contaminación virológica según las pautas establecidas en seguridad virológica de productos biológicos derivados de fuentes animales. La disociación en las subunidades de hemocianina reduce el tamaño, en el caso de la KLH hasta aproximadamente 400.000 Dalton, y hace que la proteína sea accesible a nanofiltración. El replegamiento se realiza con intercambio de tampón, por ejemplo mediante diafiltración o diálisis en condiciones de reasociación (pH 7 - 8,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ). La hemocianina reasociada puede purificarse adicionalmente mediante filtración en gel.

30 Con el fin de lograr la reasociación se añade un tampón de reasociación a la mezcla de subunidades de hemocianina.

Se fabrica KLH de alto peso molecular a partir de disolución de inmunocianina concentrada mediante intercambio de tampón en condiciones de reasociación, pH 7 - 8,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y preferiblemente mediante una etapa de concentración. Ambas pueden lograrse mediante una o hasta más de una serie de etapas de ultrafiltración usando una membrana de polisulfona con un límite de separación nominal de 50.000 Da.

## 35 Ejemplos

### Ejemplo 1: Cuarentena de *Megathura crenulata*

Desde el comienzo de las actividades de producción en la instalación en Carlsbad, California en febrero de 2002, se han recogido 13 lotes de animales en distintos periodos de tiempo. El ID del lugar de recogida es el número de zona tal como se define por el Southern California Fisheries Chart (SCFC).

40 Las condiciones meteorológicas en California durante la recogida de animales para los lotes MC-001 a MC-013 no eran inusuales. Sin embargo, cuando se recogió el lote más reciente de animales, MC-014, California había experimentado condiciones de lluvia inusuales antes de la recogida de los animales, sin embargo, el día de la recepción de los animales no se experimentaron lluvias.

45 Puede señalarse que la incorporación de métodos de prueba ha evolucionado desde que se empezaron las actividades en la instalación. Las pruebas de coliformes fecales en animales, pruebas de sustancias tóxicas, DDT y PCB se iniciaron con el n.º de lote MC-002. Las pruebas de pH y conductividad se realizaron para todos los lotes, las pruebas de nitrato, nitrito y amoníaco se iniciaron en la muestra de agua de mar con n.º de lote MC-006.

50 El pH y la conductividad del agua de mar tienen un intervalo de 8,0 a 8,3 y de 45,0 a 52,4 respectivamente. El contenido en nitrato, nitrito y amoníaco osciló entre 0 y 80 ppm, entre 0 y 0,25 ppm y entre 0,25 y 1,0 ppm respectivamente, el extremo superior del intervalo corresponde a los valores para el lote MC-014, que, como se ha señalado, se recogió tras fuertes lluvias. Los coliformes fecales de muestras de agua de mar eran  $< 2 \text{ MPN}/100 \text{ ml}$  para muestras recogidas de MC-002 a MC-013 y eran de 29, 11 y 49 MPN para el lote más reciente MC-014 que se correspondía a las tres muestras de agua “0”, “50” y “100” respectivamente.

Los resultados de las pruebas de DDT y PCB indican que están por debajo del límite de detección de los ensayos respectivos. Parece que esto no puede ser un problema en los lugares de recogida 718 y 719 de donde se recogieron los animales.

5 Los datos de coliformes fecales de animales sugieren que los coliformes fecales eran generalmente < 18 y un máximo de 20 MPN/100 gramos para los n.<sup>os</sup> de lote MC-002 a MC-013, sin embargo para el MC-014 los valores eran muy altos, 3.500 MPN/100 gramos. Estos resultados junto con los coliformes fecales en el agua de mar que los rodea sugieren que estos animales tienden a concentrar los coliformes fecales.

10 Tras la recepción de los resultados de laboratorio para coliformes fecales en animales, se decidió enviar muestras de animales de los tanques de cuarentena, se tomaron 3 animales del tanque Q1 y 3 del tanque Q2, el 19 de enero de 2005. Los animales se recibieron en los tanques el 6 de enero de 6 2005 y por tanto estuvieron presentes en el agua del tanque durante 13 días antes de la prueba. Se inició esta prueba para determinar si los procedimientos de cuarentena que se habían incorporado en el programa de fabricación tendrían un efecto sobre la reducción del contenido en coliformes fecales de animales. La copia del informe de pruebas se adjunta a este informe como un documento adjunto. Los resultados indican que los coliformes fecales de animales son < 18 MPN/100 gramos. Estos resultados son muy prometedores y sugieren que los procedimientos preparados son eficaces en la reducción del contenido en coliformes del animal, si está presente cualquiera como con este lote MC-014.

El análisis de los datos relativos a los animales y al agua de mar sugieren que:

20 El pH y la conductividad del agua de mar proporcionan información sobre las condiciones del agua de mar natural y pueden ser útiles para comparar con el agua de mar artificial preparada de manera interna. En la actualidad se tiene una especificación para el agua de mar artificial de 7,5 a 8,5 y conductividad de 46-52 mS/cm. Estas especificaciones parecen coincidir bien con los intervalos para el agua de mar natural.

25 El examen toxicológico para el agua de mar del lugar de recogida se inició basándose en el asesoramiento del Dr. Robert Mooney, Merkel & Associates, que ejerció como inspector sanitario de animales externo para los primeros tres lotes de animales recibidos, concretamente los MC-001 a MC-004. Los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren que los DDT y PCB no son un problema en el área de donde se recogen las lapas y al que se liberan.

30 El procedimiento de cuarentena de animales interno parece ayudar a reducir el contenido en coliformes del animal y es un procedimiento muy útil. En la actualidad, la liberación de animales para la fabricación necesita un mínimo de siete días desde el comienzo de la cuarentena, los datos de coliformes fecales de animales para MC-014 se obtuvieron en animales tras 13 días de mantenimiento de los animales en los tanques. Puede ser necesario iniciar una investigación más sistemática sobre la duración de la cuarentena y la reducción de coliformes fecales y determinar si la especificación establecida actual de siete días es suficiente. Se iniciaron estudios de este tipo tras la recogida de animales de aguas con un alto contenido en coliformes como fue el caso con MC-014.

#### Ejemplo 2: Aislamiento cromatográfico directo de hemocianina nativa a partir de sueros de hemolinfa

35 Los sueros de hemolinfa contienen, basándose en su origen a partir de un molusco marino, aparte de hemocianina y otros componentes del suero, niveles altos de cloruro de sodio y otros minerales. La conductividad en promedio es alrededor de 50 mS/cm. En esas presentes condiciones, la KLH no puede unirse a resinas de intercambio iónico. Para lograr la unión cuantitativa de KLH, la conductividad tiene que reducirse hasta < 20 mS/cm.

40 Con el fin de reducir la conductividad tal como se describió anteriormente, los sueros de hemolinfa se desalan de manera parcial mediante métodos adecuados tales como filtración en gel, electrodiálisis, diafiltración o dilución. La eliminación de sales conduce a la precipitación de los demás componentes del suero, es decir, proteínas e hidratos de carbono. El precipitado se elimina mediante centrifugación a baja velocidad, filtración profunda o filtración por membrana (0,8 u. 0,45 µm).

Posteriormente, se aísla la KLH de alto peso molecular disuelta coloidal mediante procedimientos de cromatografía, es decir, cromatografía IEX seguida por disociación y purificación de subunidades.

#### 45 *Disociación de hemocianina*

##### Método 1:

50 Se purifica la proteína hemocianina de unión a oxígeno nativa a partir de la hemolinfa mediante cromatografía de intercambio iónico. Se une la hemocianina a un intercambiador aniónico y luego se disocia en la columna en las subunidades de KLH (inmucianina) en tampón alcalino (pH 9,6). Se recupera la inmucianina de la columna por medio de elución en gradiente de sal. Se desala la disolución de inmucianina resultante y se concentra mediante diafiltración/ultrafiltración. Puede purificarse posteriormente la disolución de inmucianina concentrada mediante una etapa de cromatografía IEX adicional.

##### Método 2:

Se purifica la proteína hemocianina de unión a oxígeno nativa a partir de la hemolinfa mediante cromatografía de

intercambio iónico. Se une la hemocianina a un intercambiador aniónico y luego se recupera de la columna por medio de elución en gradiente de sal. Se desala la disolución de hemocianina, se concentra y se disocia en las subunidades de KLH (inmucianina) por medio de diafiltración, diálisis o ultrafiltración en tampón alcalino (pH 9,6). Finalmente se concentra la disolución de inmucianina seguido por purificación con una etapa de cromatografía IEX adicional.

5

Se disuelve la hemocianina obtenida del método 1 / método 2 en tampón de disociación (pH 9,6, exento de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ ). Esto crea condiciones alcalinas, que conducen a la disociación de la molécula de hemocianina nativa en sus subunidades. La entidad de estas subunidades se denomina inmucianina.

### Método 3:

10 Se purifica la proteína hemocianina de unión a oxígeno nativa a partir de la hemolinfa mediante cromatografía de intercambio iónico. Se une la hemocianina a un intercambiador aniónico y luego se recupera de la columna por medio de elución en gradiente de sal. Se aísla la hemocianina de la disolución de hemocianina resultante por medio de ultracentrifugación. Se disuelven los sedimentos obtenidos en tampón de disociación. Finalmente, se concentra la disolución de inmucianina y puede purificarse con una etapa de cromatografía IEX adicional.

### 15 *Concentración de disolución de inmucianina*

Antes de la purificación final (pulido) mediante filtración en gel, se concentra la disolución de inmucianina hasta un contenido en proteínas de 20 mg/ml ( $\pm 2,5$  mg/ml) mediante ultrafiltración. Con este fin, se usan membranas de poliéter sulfona o de polisulfona de baja unión a proteína (límite de separación: 30.000 Dalton; área de filtro:  $\geq 700$  cm<sup>2</sup>) montadas en una unidad de ultrafiltración de acero inoxidable.

20 Tras la ultrafiltración, se filtra la disolución de inmucianina concentrada a través de un filtro de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ .

### *Purificación (pulido)*

Se purifica finalmente la disolución de inmucianina concentrada mediante cromatografía líquida de presión media a través de una columna de filtración en gel.

### 25 Ejemplo ilustrativo 3: Nanofiltración de subunidades de KLH purificadas (inmucianina)

Debido al origen de KLH nativa existe un riesgo virológico por patógenos humanos. Para garantizar la seguridad biológica, el procedimiento posterior de compuestos biológicos debe contener etapas para la inactivación o eliminación de una posible contaminación por virus. Se sometieron a prueba métodos de inactivación disponibles comercialmente en KLH y se encontró que no eran adecuados por su efecto perjudicial sobre las preparaciones de KLH (reducción de pH, tratamiento térmico).

30

Se demostró previamente que la nanofiltración eliminaba de manera eficaz diversos virus de composiciones de proteínas. Sin embargo, la nanofiltración resultó no ser útil para las hemocianinas o KLH nativa, debido al peso molecular de la KLH nativa desde  $> 8$  millones de Dalton. Los filtros no podían discriminar virus de proteína, es decir la proteína es demasiado grande para pasar la membrana de filtros de virus típicos (tamaño de poro entre 15 y 35 nm). Se efectuó una reducción hasta el peso molecular uniforme de aproximadamente 400.000 Dalton de las subunidades de KLH. Se sometieron a prueba varios filtros de virus con diferentes tamaños de poro en un procedimiento a menor escala.

35

### *Ejemplo de referencia: Protocolo de filtración de punto muerto, filtración de virus de subunidades de KLH*

Se ha filtrado una proteína de aproximadamente 400 KD en una concentración de aproximadamente 5 mg/ml obtenida a partir de sangre de caracol marino de California a través de Planova 20 N, 0,001 m<sup>2</sup> en modo de punto muerto con una presión constante de 2,0 bar. La velocidad de flujo era de 0,4 ml/min. La formulación de proteína se estaba a un pH de 9,6 en un tampón de glicina/NaOH. Se aplicó 1 g de material de partida. Con filtración de punto muerto, se obtuvieron 0,1 g de proteína en una concentración de 0,5 mg/ml, es decir un rendimiento de proteína del 10%. Además, una reducción de las cantidades de partida de la proteína o de la concentración de la proteína en un factor de 10 o más no condujo a resultados diferentes. Además, la reducción de la presión o el aumento del tamaño no condujeron a cambios de rendimiento de proteína.

45

### *Ejemplo de trabajo: Protocolo de filtración de flujo cruzado; filtración de virus de subunidades de KLH*

Se ha filtrado una proteína de aproximadamente 400 KD en una concentración de aproximadamente 0,45 mg/ml obtenida a partir de sangre de caracol marino de California a través de Planova 20 N, 0,12 m<sup>2</sup> en modo de flujo cruzado con una presión constante de 0,16 bar. La formulación estaba en un tampón de glicina y NaOH a un pH de 9,6. La cantidad de material de partida era de 5.000 g en una concentración de 0,45 mg/ml. La cantidad de proteína obtenida tras la nanofiltración era de 4.688 g en una concentración de 0,42 mg/ml. Esto constituye un rendimiento del 93%.

50

Este ejemplo demuestra que, al contrario que la filtración de punto muerto, la filtración de flujo cruzado permite la filtración de cantidades cuantitativas de proteína hemocianina tras la disociación en sus subunidades. Pueden emplearse nanofiltros de un tamaño de poro de entre 15 y 35 nm que son suficientes para eliminar los virus más pequeños conocidos.

#### 5 Ejemplo ilustrativo 4: Prueba de concepto: Estudio de viabilidad

Este ejemplo demuestra la idoneidad de la filtración de flujo cruzado para eliminar virus pequeños de un diámetro de los virus más pequeños conocidos. En este ejemplo, se sometió a prueba PVP. El PVP tiene un diámetro de 20 nm y se hicieron adiciones conocidas del virus a una concentración del 0,5% por proteína. A la inmunocianina, una proteína de peso molecular uniforme de aproximadamente 400.000 Dalton de subunidades de KLH se le añadieron adiciones conocidas de PVP al 0,5%. La carga de virus total en el prefiltrado era de 10.620. La cantidad de proteínas tras la adición conocida de virus era de 4.814,9 g. Se realizó nanofiltración con nanofiltros Planova 20 N, 0,12 m<sup>2</sup> en modo de flujo cruzado. La velocidad de flujo elegida era de 50 mm/min con una presión constante de 0,28 bar. Se retuvieron 4.662,4 g de proteína en el filtrado. El LRF para el PVP era de 3,14 +/- 0,32. Por consiguiente, la cantidad de proteína era de más del 93% con una eliminación de virus de más del 99,9%.

15 Este ejemplo muestra que la filtración de flujo cruzado es adecuada para la preparación de KLH o subunidades de KLH en una forma libre de virus a una escala relevante comercialmente con un rendimiento de más del 90%.

#### Ejemplo 5: Estabilización de subunidades de KLH purificadas por medios de desalación

##### *Principio*

20 Se fabrica líquido a granel de KLH libre de sal a partir de inmunocianina purificada mediante desalación y concentración. Ambas se logran mediante una serie de etapas de ultrafiltración usando una membrana de polisulfona con un límite de separación nominal de 30.000 Da.

##### *Preparación del lote de desalación*

25 Con el fin de minimizar las variaciones entre lotes durante el procedimiento de desalación, se concentra disolución de inmunocianina purificada hasta un contenido en inmunocianina de entre 10 mg/ml y 40 mg/ml ( $\pm 2$  mg/ml) mediante ultrafiltración. Con este fin, se usan membranas de poliéter sulfona o de polisulfona de baja unión a proteína (límite de separación: 30.000 Da) montadas en una unidad de ultrafiltración de acero inoxidable. Antes de su uso, se acondicionan las membranas mediante recirculación con tampón de disociación alcalino a una temperatura de +2-8°C. Se logra el flujo mediante una bomba peristáltica. Finalmente, se somete a prueba el acondicionamiento mediante un control en proceso de pH y endotoxinas bacterianas. Antes de comenzar el procedimiento de concentración, se comprueba la unidad de ultrafiltración para determinar su integridad.

##### *Concentración*

35 Se transfiere ahora la disolución de inmunocianina a la unidad de ultrafiltración y se recircula a +2-8°C. Se controla la concentración pesándose el ultrafiltrado obtenido. La presión de entrada máxima de la unidad de ultrafiltración no debe exceder de 1 bar, preferiblemente de 0,5 bar. Se recircula la disolución de inmunocianina hasta que se ha recogido la cantidad de ultrafiltrado calculada. Finalmente, se somete a prueba el concentrado mediante un control en proceso del valor de pH, osmolalidad, conductividad, contenido en inmunocianina.

##### *Desalación*

40 La disolución de inmunocianina concentrada (= lote de desalación concentrado) o bien se desala por dilución 1 + 1 con agua para inyecciones en cada ciclo de ultrafiltración o bien alternativamente añadiendo el agua para inyecciones empleando un procedimiento de lavado de volumen constante. Se controla el procedimiento de desalación pesando el ultrafiltrado, el lote de desalación concentrado y se somete a prueba la conductividad del ultrafiltrado y del lote de desalación.

45 Si la conductividad del ultrafiltrado ha alcanzado  $< 10 \mu\text{S}/\text{cm}$  o si la conductividad del lote de desalación concentrado es  $< 150 \mu\text{S}/\text{cm}$ , se termina el procedimiento de desalación y se determina el contenido en inmunocianina del lote de desalación con el fin de preparar el lote final de líquido a granel de KLH libre de sal.

##### *Preparación del lote final de líquido a granel de KLH libre de sal*

50 Se prepara el lote final de líquido a granel de KLH libre de sal a partir del concentrado de inmunocianina mediante dilución hasta un contenido en inmunocianina de 20 mg/ml. Con este fin, se pesa el concentrado de inmunocianina filtrado. Se pesa con exactitud la cantidad de agua requerida para inyecciones y se añade lentamente al concentrado de inmunocianina filtrado. Se mezcla con cuidado la disolución, y se retira una muestra para el control en proceso del valor de pH, densidad, osmolalidad, conductividad, contenido en inmunocianina.

Se esteriliza finalmente la disolución liberada mediante filtración a través de un filtro de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  directamente en bolsas de infusión.

Se almacenan a +2-8°C.

Durante la filtración, se retiran muestras para control de calidad.

Ejemplo ilustrativo 6: Replegamiento de subunidades de KLH con virus filtrados y purificación final.

*Principio*

- 5 Se fabrica KLH de alto peso molecular a partir de una disolución de inmunocianina concentrada mediante diafiltración (intercambio de tampón en condiciones de reasociación, pH 7 - 8, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>) y concentración. Ambas se logran, por ejemplo mediante una serie de etapas de ultrafiltración usando una membrana de polisulfona con un límite de separación nominal de 50.000 Da.

*Concentración de la disolución de inmunocianina purificada*

- 10 Con el fin de optimizar las condiciones de reasociación, se concentra la disolución de inmunocianina purificada hasta un contenido en inmunocianina de 20 mg/ml ( $\pm$  2 mg/ml) mediante ultrafiltración. Con este fin, se usan membranas de poliéter sulfona o de polisulfona de baja unión a proteína (límite de separación: 30.000 Da) montadas en una unidad de ultrafiltración de acero inoxidable. Antes de su uso, se acondicionan las membranas con tampón de elución de la siguiente manera. En primer lugar, se aclara el sistema de ultrafiltración con tampón de elución a una temperatura de +2-8°C, mientras se cierran las salidas del filtrado. Se logra el flujo mediante una bomba peristáltica.
- 15 Finalmente, se retira completamente el tampón de elución del sistema. Se retira una muestra del lado del material retenido para el control en proceso del pH, endotoxinas bacterianas. Antes de comenzar el procedimiento de concentración, se comprueba la unidad de ultrafiltración para determinar su integridad.

- 20 Ahora se transfiere la disolución de inmunocianina a la bolsa de material retenido de la unidad de ultrafiltración. Se inicia la recirculación, y se recoge el ultrafiltrado en un vaso de precipitados que se ha pesado. Se mantiene la temperatura a +2-8°C. Como durante el acondicionamiento, la presión de entrada máxima de la unidad de ultrafiltración no debe exceder de 1 bar. Se recircula la disolución de inmunocianina hasta que se ha recogido la cantidad calculada de ultrafiltrado. Se mezcla el material retenido, mientras se cierran las salidas del filtrado, y se retira una muestra para el control en proceso de valor del pH, osmolalidad, conductividad, contenido en inmunocianina.
- 25

*Reasociación*

- 30 Con el fin de replegar las subunidades de KLH, se usa un segundo sistema de ultrafiltración con membranas de poliéter sulfona o de polisulfona de baja unión a proteína (límite de separación: 50.000 Da) montadas en una unidad de ultrafiltración de acero inoxidable. Antes de su uso, se acondicionan las membranas con tampón de reasociación de la siguiente manera. En primer lugar, se aclara el sistema de ultrafiltración con tampón de reasociación a una temperatura de +2-8°C, mientras se cierran las salidas del filtrado. Se logra el flujo mediante una bomba peristáltica. Finalmente, se retira completamente el tampón de reasociación del sistema. Se retira una muestra del lado del material retenido para el control en proceso de pH, endotoxinas bacterianas. Antes de comenzar el procedimiento de reasociación, se comprueba la unidad de ultrafiltración para determinar su integridad.

- 35 Para la reasociación, se recircula el sistema de ultrafiltración con tampón de reasociación (entre 2 a 10 veces el volumen de disolución de inmunocianina concentrada) mientras se cierran las salidas del filtrado. Se inyecta lentamente la disolución de inmunocianina concentrada en el tampón de reasociación recirculado. Se mantiene la temperatura durante todo el procedimiento de reasociación a una temperatura de +2-8°C.

- 40 Tras completar la inyección de la disolución de inmunocianina concentrada, se somete a diafiltración el lote de reasociación frente a entre 2 y 10 veces de tampón de reasociación, aplicando el procedimiento de lavado de volumen constante. Finalmente se concentra el lote hasta un contenido en KLH de 20 mg/ml.

Tras la reasociación, se filtra la disolución de KLH concentrada, a través de un filtro de membrana de 0,22  $\mu$ m.

*Purificación de KLH replegada mediante filtración en gel*

- 45 Se purifica finalmente la disolución de KLH concentrada mediante cromatografía líquida de presión media a través de una columna de filtración en gel.

*Potencia y actividad biológica, comparabilidad con KLH nativa*

Se compararon KLH nativa y KLH sintética obtenidas tras la reasociación según el método de la presente invención. Se compararon KLH sintética y KLH mediante espectroscopía de CD. Las bandas en la espectroscopía de CD eran idénticas.

- 50 Las bandas de proteínas en SDS PAGE eran idénticas cuando se compararon KLH nativa y sintética. En la KLH sintética, no se encontraron fragmentos de proteína.

También se realizó inmunoelectroforesis bidimensional para comparar KLH nativa y sintética. Se usaron sueros anti-KLH1 y anti-KLH. Los patrones inmunoelectroforéticos eran idénticos para ambas KLH, nativa y sintética, KLH. Se producen dos máximos de precipitación (uno para KLH1 y uno para KLH2) tanto para KLH sintética como nativa.

5 Las investigaciones electromicroscópicas de ambas, KLH, nativa y sintética, muestran los típicos decámeros, didecámeros y tridecámeros.

Las pruebas densiométricas y de PAGE nativa muestran que tanto KLH nativa como sintética incluyen las típicas bandas de proteínas. Se obtuvo una razón entre KLH1 y KLH2 de entre 0,9 y 1,0 para ambas KLH, sintética y nativa.

#### Ejemplo 7: Cromatografía de intercambio aniónico

10 Para el aislamiento, purificación y disociación *in situ* de hemocianina, se seleccionó cromatografía de intercambio aniónico debido a su punto isoeléctrico (pI) a ~ pH 6 y la carga negativa a pH > 7.

15 La separación por interacción hidrófoba estaba implicada debido a la aplicación de condiciones diferentes de aquellas usadas en cromatografía de intercambio iónico (IEX). En esta separación, se aplica inicialmente un tampón con una alta concentración iónica, habitualmente sulfato de amonio, a la columna. La sal en el tampón reduce la solvatación de solutos de muestra, por tanto como disminuye la solvatación, las regiones hidrófobas que quedan expuestas son adsorbidas por el medio.

En una primera serie de estudios de unión usando disoluciones de hemocianina con baja concentración de sal, se probaron diferentes medios de intercambio aniónico fuertes y débiles empaquetados en columnas (volúmenes de lecho de aproximadamente 20 - 50 ml) así como diferentes columnas de HIC para determinar su capacidad de unión.

20 Se seleccionaron medios de intercambio aniónico fuertes y débiles debido a su selectividad y propiedades de unión específicas:

Medios Poros® de 50 micrómetros para cromatografía de perfusión (HQ - intercambiador aniónico fuerte, grupo funcional: polietilenimina cuaternizada; PI - intercambiador aniónico débil, grupo funcional: polietilenimina cuaternizada; D - intercambiador aniónico débil, grupo funcional: grupos dimetilaminoalquilo DEAE).

25 Se usaron los medios Poros® de 50 micrómetros debido a su robusta estabilidad química, tamaño de partícula de 50 µm, y la gran estructura de poros (aproximadamente 6000 Å) que permite altas velocidades de flujo sin comprometer la capacidad o resolución.

También se sometieron a prueba alternativamente Q-Sepharose FF y HP (intercambiador aniónico fuerte) con tamaños de partícula de 90 µm y 34 µm. Los grupos funcionales provienen de amonio cuaternario.

30 Se realizaron pruebas de cromatografía de interacción hidrofóbica usando un kit de selección HiTrap HIC, que contenía columnas preempaquetadas listas para su uso (HiTrap HIC Phenyl FF alto sub de 1 ml, HiTrap HIC Phenyl FF bajo sub de 1 ml, HiTrap HIC Butyl FF de 1 ml y HiTrap HIC Octyl FF de 1 ml).

35 En resumen, puede no obtenerse u obtenerse solamente unión menor de hemocianina con los medios de cromatografía de interacción hidrófoba. La Q-Sepharose FF y HP y el intercambiador aniónico débil de los medios Poros® (PI y D) mostraron solamente unión menor a media. Se ha probado la capacidad de unión más alta de aproximadamente 20 mg de KLH por ml de gel con medios Poros® HQ de 50 micrómetros.

Basándose en los resultados obtenidos, se continuó el trabajo experimental con el fin de purificar la KLH directamente a partir de los sueros de hemolinfa de material de partida.

40 Los sueros de hemolinfa contienen, basándose en su origen a partir de un molusco marino, aparte de hemocianina y otros componentes del suero, altos niveles de cloruro de sodio y otros minerales. La conductividad en promedio es alrededor de 50 mS/cm. En esas presentes condiciones, la KLH no podía unirse a los medios Poros® 50 HQ seleccionados.

45 Con el fin de lograr la unión cuantitativa de KLH, se diluyeron los sueros de hemolinfa con tampón TRIS/HCl (pH 7,4, incluyendo CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> y NaCl), denominado tampón de dilución IEX. Se retiró el precipitado producido durante la dilución mediante etapas de filtración previa.

Se sometieron a prueba 4 (cuatro) series de dilución para determinar la capacidad de unión de medios Poros® 50 HQ para KLH (sueros de hemolinfa diluidos aproximadamente hasta 25 mS/cm, 20 mS/cm, 15 mS/cm y 10 mS/cm). Se realizaron las pruebas en columnas Poros® 50 HQ (aproximadamente 50 ml de gel). La elución de KLH comenzó a aproximadamente 27 mS/cm.

50 Velocidad de flujo, muestra: 5 ml/min

Velocidad de flujo, elución: 10 ml/min



Gradiente de elución: cloruro de sodio de 0,15 a 0,65 M, tampón TRIS/HCl (pH 7,4, incluyendo CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> y NaCl).

Los estudios de unión mostraron que los sueros de hemolinfa tenían que diluirse hasta < 20 mS/cm para lograr la unión cuantitativa de KLH.

- 5 Se realizaron posteriormente ejecuciones de prueba adicionales con sueros de hemolinfa diluidos hasta aproximadamente 19 mS/cm para optimizar la unión de KLH dependiente de la velocidad de alimentación de muestra. Se sometieron a prueba 4 (cuatro) flujos de muestra diferentes (4,0 ml/min, 4,6 ml/min, 5,2 ml/min y 8,0 ml/min) en las condiciones descritas anteriormente. Los resultados obtenidos demostraron la correlación entre la velocidad de alimentación y la capacidad de unión de los medios de intercambiador aniónico. Con la velocidad de flujo más baja de 4,0 ml/min (que corresponde a una velocidad de flujo lineal de aproximadamente 50 cm/h) se unieron aproximadamente 23 mg de KLH por ml de gel e incluso con la velocidad de flujo más alta de 8,0 ml/min (que corresponde a una velocidad de flujo lineal de aproximadamente 100 cm/h), la unión lograda de aproximadamente 17 mg de KLH por ml de gel fue excelente. Se monitorizó el avance de KLH mediante detección UV a 280 y 340 nm. Se iniciaron posteriormente ensayos adicionales a escala de laboratorio así como durante la ampliación a escala para optimizar el parámetro de cromatografía a consecuencia de un procedimiento de purificación y aislamiento eficaz y económico.

- 20 Además se sometió a prueba la disociación *in situ* en KLH capturada en la columna Poros® 50 HQ aplicando los parámetros de cromatografía tal como se describió anteriormente. Tras una primera etapa de aclarado con tampón TRIS/HCl (pH 7,4, incluyendo CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> y NaCl) se realizó intercambio de tampón con tampón glicina/NaOH (pH 9,6, incluyendo NaCl, EDTA). No se observó avance de KLH durante el lavado de la columna en condiciones de disociación.

Se logró la elución de la fracción de subunidades de KLH usando un gradiente de elución de cloruro de sodio de 0,075 a 0,575 M, tampón glicina/NaOH (pH 9,6, incluyendo NaCl, EDTA).

- 25 Se determinó el grado de disociación por medio de MPLC/SEC analítica (FPLC®; columna de separación: Superose® 6 HR 10/30, intervalo de separación de pesos moleculares 5 x 10<sup>3</sup> - 5 x 10<sup>6</sup> Da) y por medio de PAGE nativa. La medición de la fracción de subunidades mostró que se logró una disociación casi cuantitativa en las subunidades de KLH en la columna. Debido a la concentración de subunidades de KLH (aproximadamente 20 mg/ml) se usó la fracción filtrada (filtro de membrana de 0,22 µm) para purificación adicional mediante filtración en gel sin ningún procesamiento adicional.

- 30 Al final del programa de investigación, la cromatografía de intercambio aniónico fue el método elegido.

**REIVINDICACIONES**

1. Método de aislamiento y/o purificación de hemocianina o inmunocianina que comprende las etapas de:
  - a) proporcionar una formulación de hemocianina, en el que la formulación de hemocianina es un suero de hemolinfa derivado de un molusco marino;
  - 5 b) reducir la conductividad de la formulación proporcionada en a) hasta un valor de entre 30 mS/cm y 10 mS/cm añadiendo un tampón de dilución;
  - c) añadir la formulación diluida de hemocianina obtenida en la etapa b) a una columna de cromatografía de intercambio aniónico;
  - 10 d) lavar la columna con un tampón para purificar la hemocianina, preferiblemente para eliminar sales, y otras proteínas; y
  - e) eluir la hemocianina o inmunocianina de la columna añadiendo un segundo tampón.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el tampón para purificar es un tampón en el pH de entre 7 y 8.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que se eluye hemocianina, en el que se usa un tampón de un pH entre 7 y 8, el cual incluye iones  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ .
- 15 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que se eluye inmunocianina, en el que se emplea un tampón de un pH de entre 9 y 10, el cual está libre de iones  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ .
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el material de matriz es una matriz de intercambio aniónico que incluye partículas de un tamaño de partícula de más de 30  $\mu m$ , preferiblemente 50  $\mu m$  +/- 5  $\mu m$ .
- 20 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la matriz de intercambio aniónico incluye poros de un tamaño de poro de entre 3.000 y 8.000 Angstrom.
7. Uso de la columna de cromatografía de intercambio aniónico que comprende material que tiene un tamaño de partícula de más de 30  $\mu m$  y un tamaño de poro de entre 3.000 y 8.000 Angstrom para purificar hemocianina o sus subunidades.