

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 709**

51 Int. Cl.:

A61L 2/00 (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/EP2014/062276**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15188868**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2014 E 14731583 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 3154597**

54 Título: **Métodos de preparación para una generación novedosa de productos de KLH biológicamente seguros usados para el tratamiento de 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 2 717 709 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 de cáncer, para el desarrollo de vacunas terapéuticas conjugadas y como agentes de exposición

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere al suministro de un suero de hemolinfa biológicamente seguro, preferiblemente hemocianina, más preferiblemente KLH (hemocianina de lapa californiana).

10 La hemocianina es una proteína de cobre azul que se produce en forma libremente disuelta en la sangre de numerosos moluscos y artrópodos y transporta oxígeno. De los moluscos, los cefalópodos, los quitones, la mayoría de los gastrópodos 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 moluscos son mucho mayores. 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 difieren inmunológicamente.

20 La hemocianina de gastrópodos visible bajo un microscopio electrónico tiene un peso molecular de aproximadamente 8 millones de Da y es un didecámero. En contraposición a esto, la hemocianina de cefalópodos está dispuesta como un decámero aislado, que también difiere significativamente de la hemocianina de gastrópodos en la estructura cuaternaria.

25 Tradicionalmente, se obtuvo hemocianina de hemolinfa de *Megathura crenulata*. Más recientemente, el mercado para hemocianinas de gastrópodos se ha expandido para incluir hemocianina de *Haliotis tuberculata* y *Concholepus concholepus*. La hemolinfa de otros moluscos gastrópodos también se está investigando para determinar propiedades útiles. 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 inespecífica del sistema inmunitario que, hasta la fecha, no se entiende muy bien. Mediante la activación general del sistema inmunitario, es posible entonces lograr una reacción inmunitaria frente a otras estructuras foráneas que se han tolerado previamente. KLH se usa sobre todo como un portador de haptenos con el fin de, por tanto, lograr la formación de anticuerpos contra el hapteno.

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

35 Se encuentra KLH nativa en la hemolinfa (pH 6,0-8,0) en disolución coloidal como didecámero (peso molecular: aproximadamente 8 millones de Da) y como multidecámeros (peso molecular: de 12 a aproximadamente 32 millones de Da). 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 aproximadamente 400.000 Da. Los dos tipos de subunidades diferentes así como los dos tipos de agregación diferentes se deben al hecho de que la KLH nativa es una mezcla de dos tipos diferentes, KLH 1 y KLH 2.

40 Swerdlow *et al.*, Comparative biochemistry and physiology, 113, 1196, 537-548 caracterizan además KLH estructural y funcionalmente.

45 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 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 de animales de prueba. Los métodos descritos para la recogida de hemolinfa implican insertar una jeringa en el músculo del pie para penetrar el seno sanguíneo pedal (Harris *et al.*, "Keyhole Limpet Haemocianin: Negative Staining in the presence of Trehalose", Micron, 26 (1): 25-33 (1995). Se establecieron sistemas semiautomatizados que permitían la recogida de altas cantidades de hemolinfa sin matar a los animales. Los procedimientos de fabricación permiten extraer cantidades comerciales de hemocianina de animales que han crecido en un entorno controlado (documentos WO 02/085389, US2002/192633).

55 Existe una variedad de métodos bien conocidos para purificar hemocianinas a partir de hemolinfa en bruto, 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.

5 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 producida en condiciones que cumplan las normas sanitarias y de seguridad impuestas por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos y otras agencias reguladoras.

Breve resumen de la invención

10 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.

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

Los presentes inventores han identificado que sangre y hemolinfa tomadas de moluscos inmediatamente recogidos 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 de los mismos.

20 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 alta 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
25 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 diana. Tampoco es adecuada la filtración en gel que funciona separando el peso molecular para la eliminación de contaminantes virales debido a que el tamaño de los virus no varía significativamente del de las hemocianinas.

30 La nanofiltración se da a conocer en varios documentos con el fin de eliminar virus de preparaciones de proteínas. Por ejemplo, el documento WO2005/073252 usa nanofiltración para eliminar virus de preparaciones de inmunoglobulinas.

Por tanto, existe la necesidad de proporcionar nuevos medios para reducir la carga de virus en hemocianinas y para la separación de virus de las hemocianinas.

35 Para resolver los problemas anteriores, la presente invención proporciona los métodos y los compuestos y las composiciones expuestos a continuación:

La presente divulgación ilustra un método para la preparación de sueros de hemolinfa a partir de un molusco, comprendiendo el método una etapa de puncionar el 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).

40 Durante la punción, el molusco puede mantenerse en condiciones de cuarentena específicas, en las que los moluscos, tras obtenerse de sus fuentes naturales, se mantienen en un sistema de acuario en cuarentena en condiciones en las que no se les suministra alimentación orgánica 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.

45 La sangre obtenida tras la punción puede esterilizarse adicionalmente, usando preferiblemente filtración por membrana de 0,2 µm.

50 En un segundo aspecto (véase la reivindicación 1), se proporciona 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, más preferiblemente entre 20 y 25 nm y reasociar las subunidades obtenidas tras la nanofiltración para obtener la hemocianina sintética, preferiblemente la KLH sintética.

La divulgación proporciona además un método de aislamiento de hemocianina nativa que comprende proporcionar sueros de hemolinfa, tales como los obtenidos en el método descrito anteriormente, y aislar la hemocianina, tal como KLH, de sueros de hemolinfa, preferiblemente empleando cromatografía directa.

En una realización preferida, la cromatografía directa es una cromatografía de intercambio iónico.

El método incluye una etapa de disociar la hemocianina en subunidades del oligómero de hemocianina. Opcionalmente, también se realiza una etapa de purificar las subunidades de hemocianina. Opcionalmente, se realiza una etapa de reasociar las subunidades en la forma oligomérica de la hemocianina.

- 5 En una realización preferida, la purificación de subunidades de hemocianina se realiza incluyendo una etapa de nanofiltración con el fin de eliminar una posible contaminación biológica.

Preferiblemente, la etapa de reasociación tiene lugar comprendiendo una etapa de diafiltración o una etapa de diálisis.

La hemocianina reasociada puede purificarse finalmente mediante filtración en gel.

- 10 Preferiblemente, la hemocianina se mezcla con el sistema de tampón de estabilización para almacenamiento a largo plazo.

En una realización preferida, las subunidades son inmunocianina. Más preferiblemente, las subunidades son menores de 800.000, 500.000, 400.000, 350.000 o 300.000 Dalton, respectivamente. Lo más preferiblemente, las subunidades son de entre 300.000 y 500.000 Dalton.

- 15 En este aspecto de la invención, la disociación de hemocianina en subunidades se efectúa aplicando un pH de entre 8 y 10, preferiblemente 9 y 10. Preferiblemente, la disociación tiene lugar a un pH alcalino de entre 8 y 10, preferiblemente 9 y 10 con eliminación de los cationes bivalentes, calcio (Ca^{++}) y magnesio (Mg^{++}). La eliminación de Ca^{++} y Mg^{++} puede efectuarse añadiendo un agente de formación de quelatos, por ejemplo EDTA. En estas condiciones, KLH nativa se disocia en subunidades. Se ha encontrado que la disociación es reversible, es decir las subunidades pueden reasociarse restableciendo un valor de pH neutro (entre 6 y 9, preferiblemente entre 7 y 8) para una mezcla heterogénea de didecámeros y multidecámeros, preferiblemente si se añaden iones Ca^{++} y Mg^{++} . Una realización más preferida para disociar hemocianina tal como KLH nativa, es tal como sigue: la hemocianina se estabiliza en un tampón de estabilización a un pH neutro que incluye iones Ca^{++} y 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 nativa sin desnaturalización. Se añade un tampón alcalino que está en el intervalo de entre 8 y 10, preferiblemente 9 y 10. Lo más preferiblemente, la temperatura está por debajo de 10°C, lo más preferiblemente por debajo de 5°C, especialmente entre 2 y 8°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. Concentraciones de tampón típicas son 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. Se contemplan las mismas concentraciones que para EDTA para NaCl, si se añade. El tampón puede incluir EDTA y/o NaCl.
- 20
- 25
- 30

- 35 La disolución así obtenida de subunidades (o disolución de inmunocianina) se mantiene al pH alcalino (entre 8 y 10, preferiblemente 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°C, más preferiblemente entre 2 y 8°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 el comportamiento de agregación de isómeros de KLH, no puede aplicarse nanofiltración para 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. Pueden realizarse nanofiltraciones con nanofiltros comercialmente disponibles. Normalmente, estos filtros tienen un tamaño de poro de 15-35 nm, más preferiblemente entre 20-25 nm. Tales filtros están comercialmente disponibles como cápsulas de filtro, por ejemplo cápsulas de filtro Planova. En una realización, tales nanofiltros son 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 m² y 4 m², preferiblemente entre 0,01 m² y 0,3 m².
- 40
- 45
- 50

- Los presentes inventores encontraron que aplicar nanofiltración a subunidades de hemocianina (inmunocianina) en condiciones típicas de nanofiltros comerciales no era muy eficaz. Normalmente, las proteínas se nanofiltran empleando una suspensión de proteínas de disolución y bombeando la suspensión de proteínas de disolución con una velocidad de flujo constante de entre 0,01 y 10 ml/minuto, más preferiblemente entre 0,1 y 1 ml/minuto en el filtro de modo que la superficie del nanofiltro es perpendicular a la dirección de flujo. Un enfoque de este tipo es eficaz en la eliminación de virus. Desafortunadamente, debido al alto peso molecular de las subunidades de KLH (inmunocianina), los filtros de virus retienen no sólo virus, sino también altas cantidades de proteína. La filtración de virus clásica con un flujo perpendicular a la superficie del filtro también se conoce como "filtración de punto muerto".
- 55

Los presentes inventores encontraron que la filtración de punto muerto no se prefiere para la eliminación de virus en inmunocianina, o subunidades de hemocianina. La hemocianina, incluso tras disociación, no puede nanofiltrarse sin una importante pérdida de proteína. El ejemplo 2 compara la "filtración de punto muerto" con el modo preferido de filtración de la presente invención descrita a continuación en el presente documento. La filtración de punto muerto conduce a una pérdida de proteína de más del 40%, más del 60% o incluso más del 80%.

Por consiguiente, existía la necesidad de proporcionar un enfoque de filtración de virus mejorado y modificado. Los presentes inventores encontraron que los mismos nanofiltros descritos anteriormente han de manejarse de manera nueva y modificada: La disolución o suspensión de proteínas ha de bombearse con un flujo paralelo a la superficie de membrana. La velocidad de flujo puede estar entre 0,01 y 100 ml/minuto, de manera preferible entre 0,1 y 100 ml/minuto, más preferiblemente entre 1 y 70 ml/minuto. La presión aplicada a la disolución o suspensión de proteínas es menor de 0,1 MPa, preferiblemente menor de 10 kPa. La disolución o suspensión de proteínas se bombea o se hace fluir sobre la superficie de membrana, preferiblemente de manera repetida, más preferiblemente, con la adición de más disolución o suspensión de proteínas que contienen subunidades de hemocianina de modo que se establece un ciclo que incluye un flujo de material de partida. La nanofiltración tiene lugar preferiblemente en un tampón alcalino, lo más preferiblemente en el tampón alcalino usado para la disociación. El material de partida que se hace fluir sobre el filtro está preferiblemente en un intervalo de concentración de entre 0,1 y 10 mg/ml, más preferiblemente entre 0,1 y 1 mg/ml, lo más preferiblemente entre 0,3 y 7 mg/ml. El rendimiento de proteína tras la filtración es de más del 80%, más preferiblemente más del 90%, más preferiblemente más del 93%. Los presentes inventores han establecido que con este enfoque de nanofiltración, denominado en el presente documento filtración de "flujo cruzado" con dirección de flujo paralela a la superficie de membrana del nanofiltro, es posible una purificación de proteínas casi cuantitativa. Por consiguiente, la filtración es adecuada para la producción de subunidades de hemocianina o inmunocianina comercialmente relevantes.

Los presentes inventores también establecieron que la carga de virus puede reducirse suficientemente. Con los métodos de la presente invención, preferiblemente con filtración de flujo cruzado, al menos el 99,9% de los virus se eliminan del material de proteína. El denominado factor de reducción log es una medida de la eliminación de virus. El factor de reducción log (LRF) es la cantidad de virus eliminado de la formulación de disolución de proteínas inicial, es decir, proteína o suspensión de proteínas, expresada en una escala logarítmica (escala log dec). Un LRF de 1 significa que el 90% de los virus se eliminan, el 10% se retienen. Un LRF de 2 significa que el 99% de los virus se eliminan, el 1% se retiene. Un LRF de 3 significa que el 99,9% de los virus se eliminan, el 0,01% se retienen. Con la filtración de flujo cruzado de la presente invención, se obtiene al menos un LRF de 2 o más, más preferiblemente se obtiene un LRF de 3 o más. Más preferiblemente, se obtiene un LRF de 4 o más.

La prueba de concepto se muestra en el ejemplo 3 (estudio de viabilidad para filtración de flujo cruzado). En este experimente, se empleó un filtro de 20 nm Planova con una superficie de filtro de 0,12 m². La velocidad de flujo fue de 50 ml/minuto. Se añadió una carga de virus total de 10.620 (el 0,5% de la composición de proteína). El virus empleado para los fines de prueba fue PVP, uno de los virus más pequeños (diámetro de 20 nm). Se logró un rendimiento de proteína de más del 97% (4.662,4 g de proteína purificada en comparación con 4.814,9 g de filtrado previo). El LRF fue de 3,14 +/- 0,32.

El filtrado obtenido puede usarse con fines terapéuticos (preparaciones de inmunocianina). Por consiguiente, se proporciona 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 mediante la presente invención (véase la reivindicación 9). Preferiblemente, la filtración es una filtración de flujo cruzado. Más preferiblemente, la cantidad de una proteína obtenida es de más del 60%, más del 70%, preferiblemente más del 80%, más preferiblemente más del 90%, lo más preferiblemente más del 93% de subunidades de inmunocianina o hemocianina.

En otra realización, las subunidades de inmunocianina o hemocianina se reasocian 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 entre 7 y 8. En una realización más preferida, la reasociación se efectúa añadiendo iones Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺. Más preferiblemente, la cantidad de iones Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ es menor de 0,5 M cada uno. Más preferido, se emplean tampones tales como tampón TRIS/HCl 0,05 - 0,1 M pH 7,4, opcionalmente junto con MgCl₂ entre 0,05 M y 0,2 M, y/o CaCl₂ 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 en una realización proporciona un método de producción de KLH sintética o hemocianina sintética que comprende las etapas de disociar KLH nativa para obtener subunidades, nanofiltrar las subunidades así obtenidas usando filtros con un tamaño de poro de entre 15 y 35 nm y reasociar las subunidades obtenidas tras la nanofiltración para obtener la hemocianina sintética o KLH sintética. Preferiblemente la filtración es una filtración de flujo cruzado, más preferiblemente una filtración de flujo cruzado tal como se describió anteriormente. Normalmente, la cantidad de proteína obtenida es mayor del 60% por cantidad de KLH nativa. Más preferiblemente, la (KLH sintética o hemocianina sintética) obtenida es mayor del 70%, más preferiblemente mayor del 80%, lo más preferiblemente mayor del 90% o el 93% por cantidad de KLH nativa.

La presente invención también proporciona la hemolinfa obtenida mediante el método de la reivindicación 1, la hemocianina o las subunidades de hemocianina obtenidas mediante los métodos de la reivindicación 2. Este aspecto incluye la provisión de inmunocianina, que es una mezcla de subunidades de una hemocianina en su razón que se produce de manera natural.

- 5 En un aspecto adicional, la hemolinfa, la hemocianina o las subunidades de hemocianina son para su uso como medicamento.

Este aspecto también cubre una composición farmacéutica que comprende la hemolinfa, la hemocianina o las subunidades de hemocianina.

- 10 Las composiciones farmacéuticas o medicamentos son, por ejemplo, para su uso en el tratamiento de cáncer, preferiblemente cáncer de vejiga, o como inmunoestimulante o portador.

Según un aspecto adicional, se proporcionan subunidades de hemocianina (véase la reivindicación 15).

Detalles de la invención

En un primer aspecto se ilustra 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.

- 15 La presente divulgación se refiere al método de preparación de un material de partida de calidad farmacéutica derivado de moluscos, preferiblemente lapas californianas. La calidad de bajo contenido en endotoxinas/baja carga biológica de los sueros de hemolinfa se alcanza aplicando un procedimiento de cuarentena específico a lapas de fuente natural o de acuicultura. El diseño propio del sistema de acuario en cuarentena conduce a una reducción significativa de la contaminación biológica, es decir, bacterias, endotoxinas y virus.

- 20 Un punto clave de este primer aspecto es el tratamiento de moluscos en un sistema de acuario en cuarentena. Los animales se mantienen en condiciones de temperatura específicas y/o el acuario en cuarentena incluye medios para la eliminación de proteínas tales como un espumador de proteínas centrífugo y/o uno o más biofiltros.

- 25 Preferiblemente, se usa agua de mar artificial en el acuario y, más preferiblemente, se emplea una rápida circulación de agua de mar artificial para tratar los moluscos. La corriente en el acuario puede imitar una zona de surf en el mar. Pueden eliminarse contaminantes biológicos mediante una extensa formación de espuma y/o biofiltración del agua de cuarentena.

- 30 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, preferiblemente no se alimentan los animales, lo que de nuevo minimizó el contenido de componentes orgánicos y conduce a una reducción de contaminaciones.

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

- 35 La temperatura del agua en el entorno natural de las lapas californianas está entre 10 y 20°C, preferiblemente entre 12 - 16°C; por tanto se requiere enfriar el agua en el acuario. Con ese 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).

- 40 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 de sal de adición para parecerse al agua de mar. Por ejemplo, el valor de conductividad está entre 46-52 ms/cm y el pH 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 requiere 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 del animal en el acuario.

- 45 El procedimiento de cuarentena de animales interno de la invención ayuda a reducir la carga biológica. Por ejemplo, el contenido en coliformes de los animales puede reducirse tras cultivo en condiciones de cuarentena.

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

Un segundo punto clave del primer aspecto es, por consiguiente, el procedimiento para puncionar 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 sala limpia.

- 50 Los animales se transfieren preferiblemente a una sala limpia, donde los animales se aclaran usando disolución isotónica de hemolinfa (HIS), una disolución de cloruro de sodio propia cuya concentración de sal es isotónica con

los sueros animales.

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

5 Durante esta operación se tiene cuidado preferiblemente de no provocar lesiones internas, especialmente al sistema intestinal, por dos motivos: en primer lugar, para evitar la contaminación del producto con materia fecal y, en segundo lugar, para evitar la muerte de los animales. Si surge lesión accidental del tracto intestinal, tal como se indica por sueros de hemolinfa contaminados por materia fecal, el material se descarta.

10 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.

Tras la finalización de la extracción de sangre, puede inyectarse disolución isotónica estéril, preferiblemente a través de la cánula, y se examina el líquido que sale para determinar si el seno sanguíneo se ha alcanzado, lo cual está indicado por un fluido azul.

15 Pueden recogerse de 10 a 60 ml, más preferiblemente 30 - 50 ml o el 10 - 20%, preferiblemente el 12 - 15% del peso corporal del animal, de hemolinfa en un tubo de centrifuga estéril.

La hemolinfa que puede haberse retirado se reemplaza por disolución HIS.

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

20 Los animales se transfieren de nuevo preferiblemente, se lavan y se devuelven a los tanques de acuario de recuperación internos. Los animales pueden monitorizarse durante de 1 a 4 días y devolverse a su medio natural. Este método permite que los moluscos se devuelvan 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.

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

En un segundo aspecto se proporciona un método para la preparación de hemocianina o subunidades de hemocianina con bajo contenido en endotoxinas/baja carga biológica a partir de moluscos tales como *Megathura crenulata* en cantidades comerciales (véase la reivindicación 1).

30 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 puede comprender el aislamiento de hemocianina a partir de sueros de hemolinfa, preferiblemente por medio de cromatografía directa, más preferiblemente por medio de cromatografía de intercambio iónico.

El método comprende preferiblemente una etapa de disociar la hemocianina en las subunidades de hemocianina.

35 El método también puede comprender una etapa de purificar las subunidades de hemocianina.

El método también comprende preferiblemente 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 una posible contaminación virológica.

El método también comprende preferiblemente una etapa de reasociar la hemocianina a partir de las subunidades.

40 Los sueros de hemolinfa basados en su origen de un molusco marino contienen, además de hemocianina y otros componentes séricos, altos niveles de cloruro de sodio y otros minerales. La conductividad de los sueros de hemolinfa basada en su alto contenido en sal es, en promedio, de aproximadamente 50 ms/cm. Para lograr unión cuantitativa de hemocianina, por ejemplo de KLH, la conductividad ha de reducirse hasta < 20 mS/cm.

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

Posteriormente, la KLH de alto peso molecular disuelta coloidal puede aislarse mediante procedimientos de

5 cromatografía, es decir, cromatografía de intercambio iónico, lo cual puede ir seguido entonces por disociación y purificación de subunidades.

5 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.

10 La proteína hemocianina de unión 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 después 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). La inmunocianina se recupera de la columna por medio de elución en gradiente de sal. La disolución de inmunocianina resultante puede desalarse y concentrarse mediante diafiltración/ultrafiltración. La disolución de inmunocianina concentrada puede purificarse posteriormente mediante una etapa de cromatografía de intercambio iónico adicional.

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

20 En otra realización, la proteína hemocianina de unión a oxígeno nativa se purifica a partir de la hemolinfa mediante cromatografía de intercambio iónico. La hemocianina se une a un intercambiador aniónico y después se recupera de la columna por medio de elución en gradiente de sal. La hemocianina de la disolución de hemocianina resultante se aísla por medio de ultracentrifugación. Posteriormente, los sedimentos de hemocianina resultantes se disuelven 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.

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 sin Ca^{++} y 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 proteínas de 20 mg/ml (\pm 2,5 mg/ml), por ejemplo mediante ultrafiltración. Con este fin, se usan preferiblemente membranas de polisulfona o poliéter sulfona de baja unión a proteínas (límite de separación: 30.000 Dalton; área de filtro: \geq 700 cm^2) montadas en una unidad de ultrafiltración de acero inoxidable. Tras la ultrafiltración, la disolución de inmunocianina concentrada se filtra, por ejemplo a través de un filtro de membrana de 0,22 μm .

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

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

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

50 Según la presente invención, se usa preferiblemente nanofiltración para obtener subunidades de hemocianina purificadas, por ejemplo subunidades de KLH, es decir para la eliminación de una posible contaminación vírica.

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

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

- 5 Según la presente invención, se realiza la eliminación de al menos virus de la leucemia murina, virus de la pseudorrabia, reovirus tipo 3 y paravovirus porcino mediante nanofiltración. Con el fin de someter a prueba la eliminación, a una muestra de prueba se le añadirán adiciones conocidas de los virus a los títulos definidos y después se someterá a nanofiltración. Pueden retirarse muestras de la muestra de prueba prefiltrada, con adiciones conocidas así como del nanofiltrado y monitorizarse para determinar virus mediante titulación de punto final y
10 mediante análisis a granel, respectivamente.

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

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)	Picornaviridae	ARNmc	sin envuelta	25-30	de media a alta	FRhK-4
Virus de la diarrea viral bovina (VDVB)	Flavivirus	ARNmc	con envuelta	40-60	baja	MDBK
Parvovirus porcino (PVP)	Parvoviridae	ADNmc	sin envuelta	18-24	muy alta	PK13
Virus de simio 40 (VS40)	Papovaviridae	ADNbc	sin envuelta	40-50	alta	Vero

- 15 Virus de la hepatitis A (VHA) - virus de ARN monocatenario pequeño (25-30 nm) sin envuelta (ATCC VR-1402) con una resistencia de media a alta a inactivación fisicoquímica. La hepatitis A pertenece a la familia Picornaviridae, que 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 estudios. Sin embargo, la presencia de anticuerpos neutralizantes para este virus en productos sanguíneos y plasmáticos significa que su uso está limitado a situaciones en las que este problema no se produce.
20

- 25 Parvovirus porcino (PVP) - virus de ADN monocatenario pequeño (~18-25 nm) sin envuelta (proporcionado por Octapharma AG, Frankfurt, Alemania) con una resistencia alta a inactivación fisicoquímica. Por tanto, proporciona una prueba seria para el aclaramiento y la capacidad de reducción del sistema del proceso posterior. El virus parvovirus humano B19 puede estar presente a títulos elevados en plasma humano, y por tanto puede usarse PVP como modelo para B19 en la validación de productos derivados de plasma humano. También se notifican incidencias de contaminación de productos recombinantes con parvovirus tales como virus diminuto murino, y puede usarse PVP como modelo para esta clase de virus.

- 30 Virus de la diarrea viral bovina (VDVB) – virus de ARN monocatenario de tamaño medio (~40-60 nm) con envuelta (ATCC VR-534) con una resistencia media a inactivación fisicoquímica. VDVB pertenece a la familia Flaviviridae que también contiene los virus de la hepatitis C y hepatitis G. VDVB es, por tanto, un virus modelo adecuado cuando la hepatitis C o G es una preocupación, 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 bovino.

- 35 Virus de simio 40 (VS40) – virus de ADN bicatenario pequeño (~40 nm) sin envuelta (ATCC VR-305) con resistencia alta a inactivación fisicoquímica. VS40 proporciona una prueba seria del proceso posterior y su capacidad para eliminar/inactivar virus. Este virus actúa como 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.

- 40 En la presente invención, se eliminan al menos VHA, VDVB y VS40, preferiblemente con LRF de más de 2, 3, 4, 5 ó 6 para cada virus. PVP puede eliminarse con LRF de más de 2, 3 ó 4. Alternativamente, o además, también se eliminan virus tal como sigue de la hemocianina o inmunocianina de la presente invención: virus de la leucemia murina (MuLV), virus de la pseudorrabia (PRV) y reovirus tipo III (Reo III). Estos virus también se eliminan con LRF de al menos 2 ó 3 para cada virus.

- 45 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 condujo a preparaciones de KLH que satisfagan la estabilidad requerida para productos

5 farmacéuticos (2 - 3 años). La liofilización de proteínas de alto peso molecular con retención de toda su actividad biológica 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 inmunocianinas 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 proteína cada una.

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 de subunidad de hemocianina altamente concentrada libre de sal (20 mg/ml) en agua con estabilidad a largo plazo inesperada en condiciones refrigeradas (1 - 2 años). La disolución de subunidad de hemocianina libre de sal es el portador ideal para la fabricación de vacunas conjugadas. Los expertos en la técnica conocen medios y métodos para la desalación. Normalmente, se realiza desalación siempre que la conductividad del filtrado en un proceso de filtración iterativo sea $> 10 \mu\text{S/cm}$ o la conductividad del material retenido sea $> 150 \mu\text{S/cm}$.

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

Puede usarse subunidades de hemocianina como mezcla en la razón presente en hemocianina nativa ("inmucianina") o pueden separarse subunidades individuales y usarse tras su aislamiento.

20 Con el fin de obtener hemocianina "sintética", la reasociación de las subunidades ha de realizarse, es decir, el replegamiento de subunidades de KLH con virus filtrados.

25 El tamaño de los oligómeros de hemocianina, por ejemplo de didecámeros de KLH (aproximadamente 35 nm), se sitúa en el mismo tamaño de virus grandes. Los métodos de aislamiento y purificación descritos (cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel) para KLH nativa no conducen a los factores de reducción requeridos de la posible contaminación virológica según directrices establecidas sobre seguridad biológica de productos biológicos derivados de fuentes animales. La disociación en las subunidades de hemocianina reduce el tamaño, en el caso de KLH hasta aproximadamente 400.000 Dalton, y hace que la proteína sea accesible a la nanofiltración. Se realiza replegamiento con intercambio de tampón, por ejemplo mediante diafiltración o diálisis en condiciones de reasociación (pH 7 - 8, Ca^{++} , Mg^{++}). La hemocianina reasociada puede purificarse además 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, Ca^{++} , Mg^{++} y preferiblemente mediante una etapa de concentración. Ambas pueden lograrse mediante una o más hasta 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 inicio de las actividades de producción en la planta de Carlsbad, California en febrero de 2002, se han recogido 13 lotes de animales en diversos periodos de tiempo. La ID de sitio de recogida es el número de zona tal como se define por Southern California Fisheries Chart (SCFC).

40 Las condiciones meteorológicas en California durante la recogida de los animales para los lotes MC-001 a MC-013 no fueron inusuales. Sin embargo, durante el lote más reciente de animales recogidos, MC-014, California había experimentado condiciones de lluvia inusuales antes de la recogida de los animales, sin embargo, el día de 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 planta. Las pruebas de coliformes fecales en animales, sustancia tóxica, DDT y pruebas de PCB se iniciaron con el lote n.º MC-002. Las pruebas de pH y conductividad se han realizado para todos los lotes, las pruebas de nitrato, nitrito y amoníaco se iniciaron en la muestra de agua de mar con el lote n.º 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 alto del intervalo se corresponde con los valores para el lote MC-014, que se recogió, tal como se ha indicado tras las fuertes lluvias. Los coliformes fecales de muestras de agua de mar fueron de < 2 MPN/100 ml para muestras recogidas de MC-002 a MC-013 y fueron de 29, 11 y 49 MPN para el lote más reciente MC-014 correspondiente a las tres muestras de agua "0", "50" y "100" respectivamente.

Los resultados de prueba de DDT y PCB indican que están por debajo del límite de detección de los respectivos

ensayos. Parece que esto no es un problema en el sitio de recogida 718 y 719 de donde se recogieron los animales.

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

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 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 2005 y, por tanto, estuvieron presentes en el agua del tanque durante 13 días antes de las pruebas. Se iniciaron estas pruebas para determinar si los procedimientos de cuarentena que se han incorporado al programa de fabricación tendrían un efecto sobre la reducción del contenido de coliformes fecales de animales. La copia del informe de la prueba se adjunta a este informe como adjunto. Los resultados indican que los coliformes fecales de animales son de < 18 MPN/100 gramos. Estos resultados son muy alentadores y sugieren que los procedimientos en marcha son eficaces para reducir el contenido de coliformes de los animales, si cualquiera estuviera presente, como con este lote MC-014.

El análisis de los datos que se refieren a animales y agua de mar sugiere que:

El pH y la conductividad del agua de mar proporcionan información sobre las condiciones de agua de mar naturales y serían útiles para comparar con el agua de mar artificial preparada de manera interna. Actualmente, hay una especificación para 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 agua de mar natural.

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

El procedimiento de cuarentena de animales interno parece ayudar en la reducción del contenido de coliformes de animales y es un procedimiento muy útil. Actualmente, la liberación de animales para fabricación requiere un mínimo de siete días desde el inicio de la cuarentena, se obtuvieron los datos de coliformes fecales de animales para MC-014 en animales tras 13 días de mantenimiento del animal 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. Tales estudios van a iniciarse 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

Los sueros de hemolinfa basados en su origen a partir de un molusco marino contienen, además de hemocianina y otros componentes séricos, altos niveles de cloruro de sodio y otros minerales. La conductividad, en promedio, es de aproximadamente 50 ms/cm. En esas presentes condiciones, KLH no puede unirse a resinas de intercambio iónico. Para lograr unión cuantitativa de KLH, la conductividad ha de reducirse hasta < 20 mS/cm.

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

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

Disociación de hemocianina

Método 1:

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

Método 2:

La proteína hemocianina de unión a oxígeno nativa se purifica a partir de la hemolinfa mediante cromatografía de intercambio iónico. La hemocianina se une a un intercambiador aniónico y después se recupera de la columna por medio de elución en gradiente de sal. La disolución de hemocianina resultante se desala, se concentra y se disocia

en las subunidades de KLH (inmunocianina) por medio de diafiltración, diálisis o ultrafiltración en tampón alcalino (pH 9,6). Finalmente la disolución de inmunocianina se concentra seguido por purificación con una etapa de cromatografía IEX adicional.

- 5 La hemocianina obtenida del método 1/método 2 se disuelve en tampón de disociación (pH 9,6, sin Ca^{++} y 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 inmunocianina.

Método 3:

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

Concentración de disolución de inmunocianina

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

Tras la ultrafiltración, la disolución de inmunocianina concentrada se filtra a través de un filtro de membrana de 0,22 μm .

20 *Purificación (pulido)*

La disolución de inmunocianina concentrada se purifica finalmente mediante cromatografía de líquidos de presión media a través de una columna de filtración en gel.

Ejemplo 3: Nanofiltración de subunidades de KLH purificadas (inmunocianina)

- 25 Debido al origen de la KLH nativa, existe un riesgo virológico por patógenos humanos. Para garantizar la seguridad biológica, el proceso posterior de productos biológicos debe contener etapas para la inactivación o eliminación de una posible contaminación vírica. Se sometieron a prueba métodos de inactivación comercialmente disponibles en KLH y se encontró que no eran adecuados debido a su efecto dañino 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 hemocianinas o KLH nativa, debido al peso molecular de KLH nativa de > 8 millones de Dalton. Los filtros no podían discriminar virus de proteína, es decir la proteína es demasiado grande para pasar por la membrana de filtros de virus típicos (tamaño de poro de entre 15 y 35 nm). Se efectuó una reducción hasta el peso molecular uniforme de aproximadamente 400.000 Dalton de subunidades de KLH. Varios filtros de virus con diferentes tamaños de poro se han sometido a prueba en proceso a escala reducida.

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

- 40 Una proteína de aproximadamente 400 KD en una concentración de aproximadamente 5 mg/ml obtenida de sangre de caracoles marinos de California se ha filtrado a través de Planova 20 N, 0,001 m^2 en modo de punto muerto con presión constante de 2,0 bar. La velocidad de flujo fue de 0,4 ml/min. La formulación de proteínas 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 con 0,5 mg/ml, es decir un rendimiento de proteína del 10%. Además, una reducción de las cantidades de partida de la proteína o 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

- 50 Una proteína de aproximadamente 400 KD en una concentración de aproximadamente 0,45 mg/ml obtenida de sangre de caracoles marinos de California se ha filtrado a través de Planova 20 N, 0,12 m^2 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 fue de 5.000 g en una concentración de 0,45 mg/ml. La cantidad de proteínas obtenida tras nanofiltración fue de 4,688 g en una concentración de 0,42 mg/ml. Esto constituye un rendimiento del 93%.

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 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.

Ejemplo 4: Prueba de concepto: estudio de viabilidad

5 Este ejemplo demuestra la idoneidad de la filtración de flujo cruzado para eliminar pequeños virus de un diámetro de los virus más pequeños conocidos. En este ejemplo, se sometió a prueba PVP. PVP tiene un diámetro de 20 nm y se hicieron adiciones conocidas del virus a una concentración del 0,5% por proteína.

10 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 fue de 10.620. La cantidad de proteínas tras la adición conocida de virus fue de 4.814,9 g. Se realizó nanofiltración con nanofiltros Planova 20 N, 0,12 m² en modo de flujo cruzado. La velocidad de flujo escogida fue 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 PVP fue de 3,14 +/- 0,32. Por consiguiente, la cantidad de proteínas fue mayor del 93% con una eliminación de virus de más del 99,9%.

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 comercialmente relevante con un rendimiento de más del 90%.

15 Ejemplo 5: Estabilización de subunidades de KLH purificadas por medio de desalación

Principio

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.

20 Preparación del lote de desalación

25 Con el fin de minimizar 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 polisulfona o poliéter sulfona de baja unión a proteínas (límite de separación: 30.000 Da) montadas en una unidad de ultrafiltración de acero inoxidable. Antes de su uso, las membranas se acondicionan mediante recirculación con tampón de disociación alcalino a una temperatura de +2-8°C. Se logra el flujo mediante una bomba peristáltica. Finalmente, el acondicionamiento se somete a prueba mediante control en proceso de pH y endotoxinas bacterianas. Antes de empezar el procedimiento de concentración, se comprueba la unidad de ultrafiltración para determinar la integridad.

Concentración

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

35 *Desalación*

40 La disolución de inmunocianina concentrada (= lote de desalación concentrado) se desala o bien mediante 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. El procedimiento de desalación se controla pesando el ultrafiltrado, el lote de desalación concentrado y sometiendo a prueba la conductividad del ultrafiltrado y el lote de desalación. Si la conductividad del ultrafiltrado ha alcanzado $<$ 10 μ S/cm o si la conductividad del lote de desalación concentrado es $<$ 150 μ S/cm, el procedimiento de desalación se termina y el contenido en inmunocianina del lote de desalación se determina 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

45 El lote final de líquido a granel de KLH libre de sal se prepara 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 filtrada. Se pesa la cantidad requerida de agua para inyecciones con exactitud y se añade lentamente al concentrado de inmunocianina filtrada. La disolución se mezcla cuidadosamente, y se retira una muestra para control en proceso del valor de pH, densidad, osmolalidad, conductividad, contenido en inmunocianina.

50 La disolución liberada se esteriliza finalmente mediante filtración a través de un filtro de membrana de 0,22 μ m directamente en bolsas de infusión.

Se almacenan a +2-8°C.

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

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

Principio

5 Se fabrica KLH de alto peso molecular a partir de disolución de inmunocianina concentrada mediante diafiltración (intercambio de tampón en condiciones de reasociación, pH 7 - 8, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) 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, la disolución de inmunocianina purificada se concentra hasta un contenido en inmunocianina de 20 mg/ml (\pm 2 mg/ml) mediante ultrafiltración. Con este fin, se usan membranas de polisulfona o poliéter sulfona de baja unión a proteínas (límite de separación: 30.000 Da) montadas en una unidad de ultrafiltración de acero inoxidable. Antes de su uso, las membranas se acondicionan con tampón de elución tal como sigue. En primer lugar, el sistema de ultrafiltración se aclara 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, el tampón de elución se retira completamente del sistema. Se retira una muestra del lado de material retenido para control en proceso del pH, endotoxinas bacterianas. Antes de empezar el procedimiento de concentración, la unidad de ultrafiltración se comprueba para determinar su integridad.

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

Reasociación

25 Con el fin de replegar las subunidades de KLH, se usa un segundo sistema de ultrafiltración con membranas de polisulfona o poliéter sulfona de baja unión a proteínas (límite de separación: 50.000 Da) montadas en una unidad de ultrafiltración de acero inoxidable. Antes de su uso, las membranas se acondicionan con tampón de reasociación tal como sigue. En primer lugar, el sistema de ultrafiltración se aclara 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,

30 el tampón de reasociación se retira completamente del sistema. Se retira una muestra del lado de material retenido para control en proceso del pH, endotoxinas bacterianas. Antes de empezar el procedimiento de reasociación, la unidad de ultrafiltración se comprueba para determinar su integridad.

35 Para la reasociación, el sistema de ultrafiltración se recircula con un tampón de reasociación (entre 2 y 10 veces el volumen de disolución de inmunocianina concentrada) mientras se cierran las salidas del filtrado. La disolución de inmunocianina concentrada se inyecta lentamente en el tampón de reasociación recirculado. La temperatura durante todo el procedimiento de reasociación se mantiene a una temperatura de +2-8°C. Tras la inyección completa de la disolución de inmunocianina concentrada, el lote de reasociación se diafiltra frente a entre 2 y 10 veces de tampón de reasociación aplicando el procedimiento de lavado de volumen constante. Finalmente, el lote se concentra hasta un contenido en KLH de 20 mg/ml.

40 Tras la reasociación, la disolución de KLH se filtra a través de un filtro de membrana de 0,22 μ m.

Purificación de KLH replegada mediante filtración en gel

La disolución de KLH concentrada se purifica finalmente mediante cromatografía de líquidos de presión media a través de una columna de filtración en gel.

Actividad biológica y potencia, comparabilidad con KLH nativa

45 Se compararon KLH nativa y KLH sintética obtenida tras la reasociación según el método de la presente invención. Se compararon KLH sintética y KLH nativa por medio de espectroscopía CD. Las bandas en espectroscopía CD fueron idénticas.

Las bandas de proteína en SDS PAGE fueron idénticas cuando se compararon KLH sintética y nativa. En KLH sintética, no se encontraron fragmentos de proteína.

50 También se realizó inmunoelectroforesis bidimensional para comparar KLH sintética y nativa. Se usaron sueros anti-KLH 1 y anti-KLH. Los patrones inmunoelectroforéticos fueron idénticos para ambas, KLH nativa y sintética. Se producen dos máximos de precipitación (uno para KLH1 y uno para KLH2) tanto para KLH nativa como sintética.

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

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

REIVINDICACIONES

1. Método de producción de hemocianina de lapa californiana (KLH) sintética que comprende las etapas de
 - a) disociar KLH nativa para obtener subunidades, aplicando un pH de entre 8 y 10,
 - b) nanofiltrar las subunidades obtenidas en la etapa a) usando filtros con un tamaño de poro de entre 15 y 35 nm; y
 - c) reasociar las subunidades obtenidas tras la nanofiltración aplicando un pH de entre 6 y 9 para obtener la KLH sintética.
2. Método según la reivindicación 1, en el que las subunidades son menores de 800.000 Dalton.
3. Método según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la disociación se efectúa mediante el pH entre 9 y 10.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la filtración elimina al menos el 99,9% de la cantidad total de virus presentes en KLH nativa.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la reasociación se efectúa a un pH de entre 7 y 8.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la filtración es filtración de flujo cruzado.
7. Método según la reivindicación 6, en el que la cantidad de proteína obtenida es mayor del 60% por cantidad de KLH nativa.
8. Método según la reivindicación 6, en el que la cantidad de proteína obtenida es mayor del 90% por cantidad de KLH nativa.
9. Método de producción de inmunocianina que comprende las etapas de
 - a) disociar hemocianina de lapa californiana (KLH) nativa para obtener subunidades aplicando un pH de entre 8 y 10; y
 - b) nanofiltrar las subunidades obtenidas en la etapa a) usando filtros con un tamaño de poro de entre 15 y 35 nm.
10. Método según la reivindicación 9, en el que la disociación se efectúa a un pH de entre 9 y 10.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en el que la filtración elimina al menos el 99,9% de la cantidad total de virus presentes en KLH nativa.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que la filtración es una filtración de flujo cruzado.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en el que la cantidad de proteína obtenida es mayor del 90%.
14. Hemocianina de lapa californiana (KLH) sintética que tiene al menos el 99,9% de la cantidad total de virus presentes en KLH nativa eliminados y producida según el método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
15. Inmunocianina sintética que tiene al menos el 99,9% de la cantidad total de virus presentes en KLH nativa eliminados y obtenida mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 9-13.
16. Método de eliminación de virus de una preparación de hemocianina que comprende:
 - a) disociar la hemocianina para obtener subunidades, aplicando un pH de entre 8 y 10,
 - b) nanofiltrar las subunidades obtenidas en la etapa a) usando filtros con un tamaño de poro de entre 15 y 35 nm; y
 - c) reasociar las subunidades obtenidas tras la nanofiltración aplicando un pH de entre 6 y 9 para obtener la hemocianina purificada.