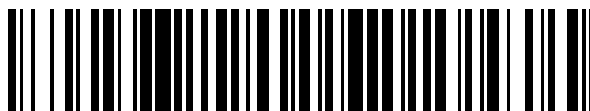


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 259**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

A61K 38/38 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2015** **PCT/FR2015/050598**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015** **WO15136217**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2015** **E 15717016 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019** **EP 3116527**

54 Título: **Procedimiento de preparación de proteínas plasmáticas humanas**

30 Prioridad:

11.03.2014 FR 1451997

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.05.2020

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANCAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)
3, avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

**BATAILLE, DAMIEN;
CHTOUROU, ABDESSATAR y
SANTAMBIEN, PATRICK**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 759 259 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de preparación de proteínas plasmáticas humanas

- 5 La invención se refiere a un procedimiento de preparación de proteínas plasmáticas humanas para uso terapéutico, a partir de plasma sanguíneo o de una fracción plasmática.

Contexto de la invención:

- 10 Numerosas patologías se tratan actualmente mediante fracciones procedentes de plasma sanguíneo enriquecidas con una o varias proteínas plasmáticas. Así, los factores de coagulación se utilizan generalmente en terapia sustitutiva, para la prevención o el tratamiento de hemorragias asociadas a deficiencias en factores de coagulación. El fibrinógeno se prescribe generalmente para el tratamiento de complicaciones asociadas a la afibrinogenemia constitucional o severa y a los síndromes hemorrágicos o riesgos de hemorragias asociados a una
- 15 hipofibrinogenemia. La albúmina está destinada a la restauración y mantenimiento del volumen sanguíneo circulante (hipovolemia confirmada). Asimismo, numerosas patologías se tratan actualmente mediante fracciones de plasma sanguíneo enriquecidas con inmunoglobulinas, y en particular con inmunoglobulinas G (IgG), que comprende generalmente más del 95% de Ig.
- 20 Por ejemplo, unas fracciones de plasma sanguíneo enriquecidas con inmunoglobulina G, o concentrados de IgG, se utilizan para corregir las deficiencias inmunitarias primitivas con defecto de producción de anticuerpo, algunas deficiencias inmunitarias secundarias, tales como las leucemias, los mielomas o las infecciones recurrentes, etc. La administración de Ig puede también tener un efecto beneficioso en el tratamiento de la Púrpura Trombopénica
- 25 Idiopática (PTI) del niño y del adulto, del síndrome de Guillain-Barré, de las polineuropatías desmielinizantes, de la neuropatía motriz multifocal, de la polirradiculoneuritis inflamatoria desmielinizante crónica (PIDC), de la enfermedad de Kawasaki, de la esclerosis múltiple, de la dermatomiositis córtico-resistente, de la miastenia aguda, de la retinocoroiditis de Birdshot, de la ictericia neonatal por incompatibilidad feto-maternal en el sistema ABO (enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad ABO), etc.
- 30 Las indicaciones terapéuticas múltiples, así como las dosis muy elevadas (que pueden ir hasta 2 g de inmunoglobulina/kg/día) que pueden prescribirse en algunos casos han generado unas situaciones de tensiones extremas en los suministros, que puede producir incluso escasez en Europa y en los Estados Unidos de América.
- 35 Asimismo, se han desarrollado numerosos procedimientos para la purificación de proteínas plasmáticas a partir de plasma sanguíneo. El procedimiento industrial que permite la extracción de las proteínas plasmáticas para un uso terapéutico se denomina "fraccionamiento plasmático". Las técnicas de fraccionamiento utilizadas en la actualidad empiezan principalmente por una etapa de crioprecipitación, que consiste en una descongelación del plasma a baja temperatura para aislar un crioprecipitado enriquecido con factor VIII, factor de Willebrand, fibrinógeno y fibronectina. Las proteínas de la fracción sobrenadante (sobrenadante de crioprecipitado) pueden después separarse por
- 40 precipitaciones secuenciales en presencia de etanol (Cohn *et al.* 1946, J. Am. Chem. Soc. 68, 459).
- Se han descrito varias variantes del procedimiento original de Cohn utilizando un fraccionamiento etanólico. Así, la publicación de Tanaka K. *et al.*, 2000 (Braz J Med Bio Res 2000, 33(1): 27-30) describe un procedimiento de purificación de inmunoglobulinas G a partir de fracciones "I+II+III" y "II+III" obtenidas después del fraccionamiento etanólico según el método de Cohn, por separación por cromatografía sobre tres tipos de geles, dos geles
- 45 intercambiadores de iones (Q-sefariosa FF y CM-sefariosa FF) y una etapa de gel filtración (Sephacryl S-300 HR).
- Se ha descrito una vía alternativa a la precipitación con etanol, por Steinbuch *et al.* (Rev. Franc. Et. Clin, y Biol. 1969, XIV, 1054) que utiliza una precipitación por el ácido octanoico (o ácido caprílico/caprilato). Este precipita la mayoría de las proteínas del plasma y conserva en el sobrenadante las inmunoglobulinas. La purificación de estas
- 50 inmunoglobulinas se continúa mediante adsorción (en "lotes") en un intercambiador de aniones, la DEAE-celulosa, que deja también las inmunoglobulinas en el sobrenadante. Este se concentra después por ultrafiltración.
- Sin embargo, estas precipitaciones con etanol o con ácido caprílico pueden provocar una cierta desnaturalización de las proteínas y la formación de agregados proteicos (especialmente de polímeros de inmunoglobulina), que pueden causar reacciones anafilácticas. Por lo tanto, es necesario proceder a etapas posteriores de tratamiento, por ejemplo con propiolactona o con agentes reductores y alquilantes, o a pH 4, o con PEG para precipitar los agregados. Estas etapas adicionales tienden a disminuir el rendimiento en proteínas plasmáticas.
- 55 Sin embargo, estas precipitaciones con etanol o con ácido caprílico pueden provocar una cierta desnaturalización de las proteínas y la formación de agregados proteicos (especialmente de polímeros de inmunoglobulina), que pueden causar reacciones anafilácticas. Por lo tanto, es necesario proceder a etapas posteriores de tratamiento, por ejemplo con propiolactona o con agentes reductores y alquilantes, o a pH 4, o con PEG para precipitar los agregados. Estas etapas adicionales tienden a disminuir el rendimiento en proteínas plasmáticas.
- 60 Así, la mayoría de los procedimientos de fabricación reivindican un rendimiento en IgG comprendido entre 3,5 y 5,5 g de IgG por litro de plasma fraccionado ("*A modified caprylic acid method for manufacturing immunoglobulin G from human plasma with high yield and efficient virus clearance*" - Vox Sang. 2006 Feb;90(2):97-104. y "*A new methodology for polyvalent intravenous immunoglobulin solution production with a two-stage process of viral inactivation Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*" - vol. 46, nº 4, out./dez., 2010),
- 65

La aplicación de un fraccionamiento etanólico es, por otro lado, relativamente costosa. En efecto, el fraccionamiento de un solo litro de plasma necesita el uso de 2l de etanol. Para el tratamiento de varios miles de litros de plasma, es por lo tanto necesario almacenar grandes cantidades de etanol directamente en el sitio de producción, y además hay que refrigerar las instalaciones dedicadas al fraccionamiento etanólico. Además, las instalaciones industriales deben estar adaptadas para el almacenamiento, el tratamiento, la eliminación y, eventualmente, el reciclaje de grandes volúmenes de disolvente, lo que representa unas limitaciones técnicas y costes no despreciables.

La pureza de las proteínas plasmáticas es un reto importante para garantizar la mejor eficacia e inocuidad de estas durante su utilización. Así, el fraccionamiento etanólico o caprílico debe complementarse mediante otras etapas de purificación para alcanzar la pureza deseada, pero estas operaciones se realizan en detrimento del rendimiento tras pérdidas suplementarias de producto. Para estas etapas adicionales, las técnicas de cromatografía se utilizan cada vez más ya que se caracterizan por índices de purificación importantes junto con rendimientos elevados. Por lo tanto, es interesante aplicar estas técnicas de cromatografía lo más cerca posible del plasma de partida a fin de ganar en rendimiento y en pureza, conservando al mismo tiempo la integridad de las proteínas de interés. Esto se aplica ya para la captura de proteínas plasmáticas poco abundantes, tales como el factor XI, el factor IX, el factor VIII, el factor Von Willebrand, la proteína C, la antitrombina III, etc. Pero, para las proteínas abundantes, tales como las inmunoglobulinas polivalentes, la albúmina, el fibrinógeno, los volúmenes de gel de cromatografía necesarios para la captura de estas moléculas serían demasiado elevados y llevarían a herramientas industriales no rentables (tamaño de los equipos y costes de los geles). Aunque algunos describen la acumulación de ciclos (*"Description and assessment of an industrial chromatography unit for preparing Human plasma Albumin. - Biotechnology of Blood Proteins"* 1993, vol 227, p. 176-181) de cromatografía para tratar grandes cantidades de proteínas, estas prácticas no son óptimas y están todavía poco desarrolladas.

Por lo tanto, existe todavía una necesidad importante de aumentar el rendimiento de la producción de proteínas plasmáticas de uso terapéutico, y en particular de las inmunoglobulinas, albúmina y/o fibrinógeno, asegurando al mismo tiempo que el producto final presente una pureza elevada y esté desprovisto de contaminantes potencialmente perjudiciales.

Resumen de la invención:

De manera general, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de una fracción de proteínas plasmáticas humanas purificadas con un rendimiento elevado, y especialmente superior al rendimiento de los procedimientos conocidos por el experto en la materia. Para ello, la solicitante ha desarrollado un procedimiento de preparación de un concentrado de proteínas plasmáticas humanas purificadas a partir de plasma sanguíneo, que comprende al menos una etapa de purificación por cromatografía multicolumna, y especialmente por cromatografía multicolumna de afinidad o intercambiadora de iones o por interacciones hidrófobas o una combinación de ligandos químicos (multi-modal). Más precisamente, el procedimiento según la invención propone realizar una etapa de cromatografía fraccionando la columna de cromatografía habitualmente utilizada en varias columnas más pequeñas, colocadas en series o gestionadas de manera independiente. Tal etapa que utiliza una cromatografía multicolumna permite por un lado utilizar el máximo de los grupos funcionales presentes en el gel de cromatografía y, por otro lado, reducir fuertemente el volumen de gel de cromatografía a utilizar por lote de preparación de proteínas plasmáticas.

La invención tal como se define en las reivindicaciones tiene por objeto un procedimiento de preparación de concentrados de proteínas plasmáticas purificadas de uso terapéutico a partir de plasma sanguíneo que comprende unas etapas de purificación según las cuales se somete sucesivamente el plasma sanguíneo o una fracción plasmática a tres cromatografías multicolumna, a fin de recuperar sucesivamente tres concentrados de proteínas plasmáticas purificadas, siendo dichos concentrados de proteínas plasmáticas purificadas de uso terapéutico un concentrado de inmunoglobulinas, un concentrado de fibrinógeno y un concentrado de albúmina.

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas (Ig) humanas con un rendimiento superior con respecto a los procedimientos conocidos por el experto en la materia. Para ello, la solicitante ha desarrollado un procedimiento de preparación de Ig purificadas, en el que la etapa inicial de fraccionamiento con etanol y/o ácido caprílico, se sustituye por una etapa de captura por cromatografía multicolumna, y especialmente por cromatografía multicolumna de afinidad o intercambiadora de iones o por interacciones hidrófobas o una combinación de ligandos químicos (multimodal). Ninguna etapa de eliminación de los contaminantes proteicos por precipitación se realiza antes de la cromatografía. El plasma sanguíneo o criosobrenadante de plasma sanguíneo se somete directamente a dicha cromatografía multicolumna. En el caso en el que la cromatografía multicolumna es una cromatografía de intercambio de aniones, el procedimiento según la invención puede comprender ventajosamente una etapa de fraccionamiento con ácido caprílico y/o etanol tras esta cromatografía.

La invención tiene por lo tanto como objeto un procedimiento de preparación de un concentrado de proteínas plasmáticas purificadas de uso terapéutico a partir de plasma sanguíneo que comprende una etapa de purificación según la cual se somete un plasma sanguíneo o una fracción plasmática a una cromatografía multicolumna.

Especialmente, la invención tiene como objeto un procedimiento de preparación de concentrados de inmunoglobulinas humanas de uso terapéutico a partir de plasma sanguíneo que comprende una etapa de purificación de las inmunoglobulinas según la cual se somete un plasma o un sobrenadante de plasma crioprecipitado a una cromatografía multicolumna de afinidad.

En otro ejemplo de realización, la etapa de purificación de las inmunoglobulinas se realiza sometiendo un plasma o un sobrenadante de plasma crioprecipitado a una cromatografía multicolumna de intercambio de aniones. Es entonces posible prever una etapa posterior de purificación por precipitación con ácido caprílico al final de la cual se recupera el sobrenadante que contiene las inmunoglobulinas.

La invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación de concentrados de albúmina y/o de fibrinógeno humanos de uso terapéutico a partir de plasma sanguíneo que comprende una etapa de purificación de la albúmina y/o del fibrinógeno según la cual se somete el plasma o sobrenadante de plasma crioprecipitado a una cromatografía multicolumna, y especialmente por cromatografía multicolumna de afinidad o intercambiadora de iones o mediante interacciones hidrófobas o una combinación de ligandos químicos (multimodal).

Según un modo de realización particular de la invención, la cromatografía multicolumna de afinidad o intercambiadora de iones captura la proteína de interés (fibrinógeno y/o albúmina) que puede después eluirse. Según otro modo de realización particular de la invención, la cromatografía multicolumna de afinidad o intercambiadora de iones captura los contaminantes a fin de recuperar la proteína de interés (albúmina y/o fibrinógeno) en la fracción no retenida. Según la invención, tal procedimiento puede también comprender una etapa adicional posterior según la cual se somete la fracción que contiene la albúmina y/o el fibrinógeno a una etapa de purificación por precipitación, al final de la cual los contaminantes se quedan en solución.

De manera general, según la invención, es posible proceder a la etapa de purificación de una proteína plasmática de uso terapéutico por cromatografía multicolumna directamente a partir de plasma sanguíneo, o de criosobrenadante, o de una fracción etanólica o caprílica, eventualmente asegurada viralmente, o de cualquier producto procedente de una etapa intermedia de purificación y especialmente de una filtración, de otra cromatografía, incluso de una cromatografía multicolumna, etc.

En un modo de realización particular de la invención, se somete directamente el plasma o sobrenadante de plasma crioprecipitado a una primera cromatografía multicolumna para capturar una proteína plasmática, después la fracción no retenida de esta cromatografía se somete a una segunda cromatografía multicolumna para capturar una segunda proteína plasmática.

A continuación, la fracción no retenida de la segunda cromatografía multicolumna puede someterse a una cromatografía, especialmente una cromatografía multicolumna, o a una etapa de precipitación para purificar una tercera proteína plasmática.

En un ejemplo de realización particular, el procedimiento según la invención consiste en un procedimiento de preparación de un concentrado de albúmina y/o de fibrinógeno de uso terapéutico a partir de plasma sanguíneo que comprende una etapa de purificación de sobrenadante de plasma crioprecipitado por cromatografía multicolumna de afinidad o intercambiadora de iones, seguida eventualmente de una etapa de eliminación de los contaminantes presentes en la fracción que comprende la albúmina y/o el fibrinógeno, por ejemplo por precipitación de dicha fracción con etanol. En otro ejemplo de realización, la etapa de purificación por cromatografía multicolumna intercambiadora de iones o por interacciones hidrófobas o una combinación de ligandos químicos (multimodal) se realiza sobre una fracción plasmática agotada de inmunoglobulinas. Ventajosamente, el procedimiento de preparación de un concentrado de albúmina y/o de fibrinógeno se realiza tras un procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas, eventualmente por cromatografía multicolumna, utilizando la fracción plasmática recuperada al final de dicho procedimiento.

Así, la invención tiene también por objeto un procedimiento de fraccionamiento de plasma sanguíneo que comprende las etapas que consisten en someter directamente el plasma sanguíneo o el sobrenadante de plasma crioprecipitado sucesivamente a:

- una cromatografía multicolumna por intercambio de iones o por interacciones hidrófobas o una combinación de ligandos químicos (multimodal) al final del cual se recupera la fracción que contiene las inmunoglobulinas; después

- una cromatografía multicolumna intercambiadora de iones o por interacciones hidrófobas o una combinación de ligandos químicos (multimodal) al final del cual se recupera la fracción que contiene la albúmina; después

- una cromatografía multicolumna intercambiadora de iones o por interacciones hidrófobas o una combinación de ligandos químicos (multimodal) al final de la cual se recupera la fracción que contiene el fibrinógeno.

La encadenación de las tres etapas puede eventualmente modificarse, a fin de favorecer la extracción de una de las proteínas con respecto a las otras dos, según la necesidad.

Así, la invención tiene también por objeto un procedimiento de fraccionamiento de plasma sanguíneo que comprende las etapas que consisten en someter directamente el plasma sanguíneo o el sobrenadante de plasma crioprecipitado sucesivamente a:

- una cromatografía multicolumna por intercambio de iones o por interacciones hidrófobas o una combinación de ligandos químicos (multimodal) al final de la cual se recupera la fracción que contiene las inmunoglobulinas; después

- una cromatografía multicolumna intercambiadora de iones o por interacciones hidrófobas o una combinación de ligandos químicos (multimodal) al final de la cual se recupera la fracción que contiene el fibrinógeno; después

- una cromatografía multicolumna intercambiadora de iones o por interacciones hidrófobas o una combinación de ligandos químicos (multimodal) al final de la cual se recupera la fracción que contiene la albúmina.

La fracción plasmática se somete así sucesivamente a tres cromatografías multicolumna al final de las cuales queda agotada sucesivamente de inmunoglobulinas, de albúmina y después de fibrinógeno, u otra cadena.

En un ejemplo de realización particular, el procedimiento según la invención consiste en un procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas de uso terapéutico a partir de plasma sanguíneo que comprende sucesivamente:

(a) una primera etapa de inactivación o eliminación viral por tratamiento fisicoquímico del plasma tal como un tratamiento con disolvente/detergente o detergente solo o disolvente solo sin limitación de las combinaciones posibles de las entidades relativas;

(b) una etapa de purificación de sobrenadante de plasma crioprecipitado por cromatografía multicolumna de afinidad del plasma inactivado al final de la etapa (a);

(c) eventualmente una etapa de eliminación de anticuerpos anti-hemaglutininas, especialmente por cromatografía multicolumna de afinidad anti-A y anti-B, del concentrado de inmunoglobulinas procedente de la etapa (b);

(d) eventualmente una segunda etapa de inactivación o eliminación viral por nanofiltración del concentrado de inmunoglobulinas procedente de la etapa (b) o (c); y

(e) una etapa de adición de uno o varios estabilizantes farmacéuticamente aceptables al concentrado de inmunoglobulinas procedente de la etapa (b), (c) o (d).

En otro ejemplo de realización particular, el procedimiento según la invención consiste en un procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulina de uso terapéutico a partir de plasma sanguíneo que comprende, sucesivamente:

(a') una etapa de purificación de sobrenadante de plasma crioprecipitado por cromatografía multicolumna de afinidad;

(b') una primera etapa de inactivación o eliminación viral por disolvente/detergente del concentrado de inmunoglobulinas obtenido en la etapa (a');

(c') eventualmente una etapa de eliminación de anticuerpo anti-A y anti-B, especialmente por cromatografía multicolumna de afinidad, del concentrado de inmunoglobulinas procedente de la etapa (b');

(d') eventualmente una segunda etapa de inactivación o eliminación viral por nanofiltración del concentrado de inmunoglobulinas procedente de la etapa (b') o (c'); y

(e') una etapa de adición de uno o varios estabilizantes farmacéuticamente aceptables al concentrado de inmunoglobulinas procedente de la etapa (b'), (c') o (d').

En otro ejemplo de realización particular, el procedimiento según la invención consiste en un procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas de uso terapéutico a partir de plasma sanguíneo que comprende sucesivamente:

(A) una etapa de fraccionamiento etanólico y/o caprílico de sobrenadante de plasma crioprecipitado;

(B) eventualmente una primera etapa de inactivación o eliminación viral por disolvente/detergente de la solución obtenida en la etapa (A);

(C) una etapa de purificación por cromatografía multicolumna de intercambio de aniones de la solución obtenida en la etapa (A) o (B);

5 (D) eventualmente una etapa de eliminación de anticuerpos anti-A y anti-B, especialmente por cromatografía multicolumna de afinidad, del concentrado de inmunoglobulinas obtenido al final de la etapa (C);

(E) eventualmente una segunda etapa de inactivación o eliminación viral por nanofiltración del concentrado de inmunoglobulinas obtenido al final de la etapa (C) o (D); y

10 (F) una etapa de adición de uno o varios estabilizantes farmacéuticamente aceptables para el concentrado de inmunoglobulinas procedente de la etapa (C), (D) o (E).

La invención tiene también por objeto un procedimiento de fraccionamiento de plasma sanguíneo que comprende las etapas que consisten en someter directamente el plasma sanguíneo o el sobrenadante de plasma crioprecipitado a:

15 - una cromatografía multicolumna de afinidad en la que al menos un ligando de afinidad es un ligando que une específicamente las inmunoglobulinas, al final de la cual se recupera la fracción que contiene las inmunoglobulinas; y/o

20 - una cromatografía multicolumna intercambiadora de iones, mediante interacciones hidrófobas o una combinación de ligandos químicos (multimodal) denominada modo mixto/multimodal ("mixed-mode chromatography"), de manera opcional altamente tolerante a la sal ("salt tolerant"), al final de la cual se recupera la fracción que contiene el fibrinógeno y/o la albúmina.

25 La invención tiene también por objeto un procedimiento de fraccionamiento de plasma sanguíneo que comprende las etapas que consisten en someter directamente el plasma sanguíneo o el sobrenadante de plasma crioprecipitado a:

30 - una cromatografía multicolumna de afinidad en la que al menos un ligando de afinidad es un ligando que une específicamente las inmunoglobulinas, al final de la cual se recupera la fracción que contiene las inmunoglobulinas; y/o

- una cromatografía multicolumna de afinidad en la que al menos un ligando de afinidad es un ligando que une específicamente el fibrinógeno, al final de la cual se recupera la fracción que contiene el fibrinógeno; y/o

35 - una cromatografía multicolumna intercambiadora de iones, por interacciones hidrófobas o una combinación de ligandos químicos (multimodal) denominado modo mixto/multimodal ("mixed-mode chromatography"), de manera opcional altamente tolerante a la sal ("salt tolerant"), al final de la cual se recupera la fracción que contiene la albúmina.

40 Ventajosamente, la cromatografía multicolumna de afinidad dirigida a las inmunoglobulinas se realiza en primer lugar, realizándose la o las cromatografías multicolumna de afinidad y de intercambio de iones dirigidas al fibrinógeno y/o la albúmina a partir de la fracción procedente de esta primera etapa de fraccionamiento y empobrecida de inmunoglobulina de tipo G. La cromatografía multicolumna de captura de la albúmina se puede realizar de manera ventajosa en tercera posición.

45 Breve descripción de las figuras

La figura 1 (Figuras 1A-1D) representa, de manera esquemática, el principio de la cromatografía multicolumna tal como se utiliza en el procedimiento según la invención;

50 La figura 2 representa, de manera esquemática, el encadenamiento de las etapas para la purificación de forma continua las proteínas abundantes del plasma mediante una sucesión de cromatografías multicolumna, según un ejemplo de realización del procedimiento según la invención;

55 La figura 3 es una imagen de un gel SDS-PAGE en condiciones no reductora y coloración azul de Coomassie de las fracciones obtenidas al final de las cromatografías multicolumna realizadas en los ejemplos 2, 3 y 4.

Descripción detallada

60 Definición

Por "proteína plasmática" se entiende, según la invención, cualquier proteína, y más particularmente cualquier proteína de interés industrial o terapéutico, contenida en el plasma sanguíneo. Las proteínas del plasma sanguíneo abarcan la albúmina, alfa/macroglobulina, antitrombina, antitripsina, Apo A, Apo B, Apo C, Apo D, Apo E, Apo F, Apo G, beta Xlla, C 1-inhibidor, proteína C-reactiva, C7, C1r, C1s, C2 C3, C4, C4bP, C5, C6, C1q, C8, C9, carboxipeptidasa N, ceruloplasmina, factor B, factor D, factor H, factor I, factor IX, factor V, factor VII, factor

VIIIa, factor VIII, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, fibrinógeno, fibronectina, haptoglobina, hemopexina, heparina cofactor II, histidina rich GP, IgA, IgD, IgE, IgG, ITI, IgM, quininasa II, quininógeno HPM, lisozima, PAI 2, PAI I, PCI, plasmina, inhibidor de la plasmina, plasminógeno, prealbúmina, precalicreína, properdina, proteasa nexina INH, proteína C, proteína S, proteína Z, protrombina, suero amiloide proteína (SAP), TFPI, tiol-proteinasa, trombomodulina, factor tisular (TF), TPA, transcolabamina II, transcortina, transferrina, vitronectina, y el factor de Willebrand.

Especialmente, las proteínas plasmáticas abarcan las proteínas de la coagulación, es decir las proteínas plasmáticas implicadas en la cadena de reacciones en cascada que llevan a la formación de un coágulo sanguíneo. Las proteínas de la coagulación abarcan el factor I (fibrinógeno), el factor II (protrombina), el factor V (proacelerina), el factor VII (proconvertina), el factor VIII (factor anti-hemofílico A), el factor IX (factor anti-hemofílico B), el factor X (factor Stuart), el factor XI (factor Rosenthal o PTA), el factor XII (factor Hageman), el factor XIII (factor que estabiliza la fibrina o FSF), la PK (Precalicroína) el KHPM (quininógeno de alto peso molecular), el factor III (tromboplastina o factor tisular), el cofactor II de la heparina (HCII), la proteína C (PC), la trombomodulina (TM), la proteína S (PS), el factor de Willebrand (Wf) y el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), o también los factores tisulares.

En algunos modos de realización, la proteína plasmática consiste en una proteína de la coagulación con actividad enzimática. Las proteínas de la coagulación con actividad enzimática abarcan las formas activadas del factor II (protrombina), factor VII (proconvertina), factor IX (factor anti-hemofílico B), factor X (factor Stuart), factor XI (Factor Rosenthal o PTA), factor XII (factor Hageman), factor XIII (factor que estabiliza la fibrina o FSF) y de la PK (Precalicroína).

En el contexto de la invención, se entiende por "Inmunoglobulinas humanas" o "Ig humanas", unas inmunoglobulinas polivalentes que pueden ser unas inmunoglobulinas A (IgA), unas inmunoglobulinas E (IgE), unas inmunoglobulinas M (IgM) o unas inmunoglobulinas G (IgG). Las inmunoglobulinas humanas según la invención son ventajosamente unas IgG, sea cual sea su sub-clase (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Puede tratarse de inmunoglobulinas enteras, o de cualquier fracción intermedia obtenida durante el procedimiento de fabricación de las inmunoglobulinas polivalentes.

Por "fracción plasmática" se entiende cualquier parte o sub-parte del plasma, que haya sido objeto de una o varias etapas de purificación. Las fracciones plasmáticas incluyen así el sobrenadante de plasma crioprecipitado, el crioprecipitado de plasma (resuspensión), las fracciones I a V obtenidas por fraccionamiento etanólico (según el método de Cohn o de Kistler & Nitschmann), el sobrenadante y el precipitado obtenidos después de la precipitación con ácido caprílico y/o caprilato, los eluidos de cromatografía y las fracciones no adsorbidas de las columnas de cromatografía, incluyendo unas cromatografías multicolumna, y los filtrados.

Según la invención, el "sobrenadante de plasma crioprecipitado" o "criosobrenadante" corresponde a la fase líquida obtenida después de la descongelación de plasma congelado (crioprecipitación). Especialmente, el criosobrenadante se puede obtener por congelación de plasma sanguíneo a una temperatura comprendida entre -10°C y -40°C, después una descongelación suave a una temperatura comprendida entre 0°C y +6°C, preferiblemente entre 0°C y +1°C, seguida de una centrifugación del plasma descongelado para separar el crioprecipitado y el criosobrenadante. El crioprecipitado se concentra con fibrinógeno, fibronectina, factor von Willebrand y factor VIII, mientras que el criosobrenadante contiene los factores del complemento, los factores vitamina K dependientes tales como la proteína C, la proteína S, la proteína Z, el factor II, el factor VII, el factor IX y el factor X, el fibrinógeno y las inmunoglobulinas y la albúmina.

Por "etapa de purificación", se entiende cualquier etapa de un procedimiento que permite el enriquecimiento de un producto de interés, y especialmente una proteína plasmática, en una fracción dada.

El procedimiento de preparación según la invención se basa principalmente en el uso de una etapa de cromatografía multicolumna para la purificación de una proteína plasmática de uso terapéutico a partir de plasma sanguíneo o de cualquier fracción plasmática. La realización de tal etapa de cromatografía multicolumna está particularmente adaptada para la preparación de un concentrado de inmunoglobulinas. En efecto, es posible, según la invención, someter directamente plasma sanguíneo humano o un criosobrenadante de plasma sanguíneo humano a una cromatografía multicolumna. Por supuesto, es también posible prever una etapa de filtración y/o fraccionamiento etanólico/caprílico antes que la purificación por cromatografía multicolumna.

El uso de tal cromatografía multicolumna permite, de manera general, una disminución a escala industrial del precio de fabricación de las proteínas plasmáticas de uso terapéutico. Especialmente, la cromatografía multicolumna permite utilizar el soporte cromatográfico con saturación total de su capacidad, lo que requiere una cantidad de gel menor que una cromatografía clásica cuyo uso habitual es limitar la capacidad a partir de la detección del 10% de fuga en molécula de interés. Asimismo, realizándose las fases de elución, lavado y saneamiento sobre unas columnas más pequeñas, las necesidades en soluciones y tampones se reducen ampliamente con respecto a una cromatografía clásica. Si el principio de fraccionamiento de las moléculas plasmática por cromatografías en cascada ya se ha descrito (John Curling *et al.* "A comparative study of Cohn and chromatographic fractionation using a novel affinity "Cascade Process" congreso PPB mayo de 2005), éste tiene sólo un interés industrial limitado debido a unas bajas capacidades y productividades asociadas. De manera particularmente sorprendente y ventajosa, la utilización

de la cromatografía multicolumna según la invención hace el principio de la cromatografía en cascada mucho más atractivo, permitiendo una mejor capacidad de captura y/o una mejor productividad expresada en unidad de masa de producto extraído por unidad de tiempo y volumen de gel.

5 El principio de la cromatografía multicolumna se representa de manera esquemática en la figura 1. Tal cromatografía multicolumna permite el fraccionamiento de una columna (un soporte de cromatografía) clásicamente utilizada en cromatografía, en varias columnas (del mismo soporte de cromatografía) de tamaño más pequeño y unidas entre sí de manera que la salida de una esté conectada a la entrada de la otra.

10 De manera general, la cromatografía multicolumna excluye la yuxtaposición (en serie o en paralelo) de varias columnas de cromatografía de naturalezas diferentes.

En resumen, la fracción a purificar se inyecta sobre una columna 1 (figura 1A), cuya salida está unida en serie a una columna 2. Así, las fugas de la proteína plasmática de interés que salen de la columna 1, en lugar de partir en una fracción recogida denominada no adsorbida, se recuperan en la columna 2 (columna de protección) en la que la proteína plasmática de interés residual podrá adsorberse. El número de columnas de protección 2, 3, 4, etc. situadas en serie después de la columna 1 depende de la proporción de fuga de proteína de interés a recuperar (en el ejemplo descrito aquí se representan 3 columnas de protección 2-4). Una vez finalizados la carga y después el lavado de la columna 1 (figuras 1A y 1B), se puede separar de las otras columnas 2-4 a fin de sufrir individualmente unas etapas de elución (figura 1C), regeneración (figuras 1D) y eventualmente un equilibrado (no representado). Una vez reequilibrada la columna 1, ésta se puede volver a colocar en serie, como última columna de protección, etc.

En paralelo, la columna 2, parcialmente cargada, pasa entonces en la primera posición y sufre a su vez una carga en fracción plasmática cuyas fugas son de nuevo recuperadas sobre las columnas de protección 3 y 4 siguientes, y así seguidamente.

La cromatografía multicolumna permite así optimizar la saturación del gel sin perder producto por perforación, ya que las fugas se recuperan sobre las columnas de protección.

Según la invención, se pueden utilizar varias técnicas de cromatografía multicolumna. Se conoce en particular la tecnología "Lecho Móvil Simulado" o "SMB" (en inglés: "Simulated Moving Bed") de la cual deriva la tecnología SMCC (en inglés: "Sequential Multicolumn Chromatography") que están particularmente adaptadas a la realización del procedimiento según la invención. Unos ejemplos de realización de cromatografías multicolumna se describen en las solicitudes de patente WO2007/144476 y WO2009/122281.

Según la invención, la cromatografía multicolumna puede ser una cromatografía de afinidad, intercambiadora de iones (aniones o cationes), hidrófoba, en modo mixto o de exclusión de tamaño. Preferiblemente, la cromatografía multicolumna es una cromatografía multicolumna de afinidad, en modo mixto o intercambiadora de aniones.

En un ejemplo de realización particular de la invención, la cromatografía multicolumna es una cromatografía radial, es decir que utiliza unas columnas radiales. Según la invención, es posible utilizar unas columnas radiales que presentan una proporción de al menos dos entre la superficie del diámetro exterior (lado de la entrada) más grande y la superficie del diámetro interior (lado de la salida) más pequeña. Estas columnas permiten aumentar los caudales de cargas, haciendo el procedimiento particularmente ventajoso cuando existen volúmenes de plasma importantes a tratar y/o que la proteína plasmática de interés, tales como las inmunoglobulinas, debe purificarse rápidamente a fin de conservar su integridad molecular. Asimismo, esto permite reducir la duración de las etapas de purificación y así multiplicar los lotes por unidad de tiempo.

Según las necesidades, y más particularmente los volúmenes de plasma a tratar, se pueden utilizar unas columnas de cromatografía de algunos mililitros (para una realización a escala del laboratorio por ejemplo) por ejemplo de 5 a 20 ml, hasta varios centenares o miles de litros (a escala industrial), por ejemplo de 200 a 2000 l. Para cada gama de columnas, es también posible adaptar la altura de lecho de gel que forma la fase estacionaria, por ejemplo 6 cm, 12 cm o 18 cm. El experto en la materia sabe, en función de los volúmenes a tratar y/o del caudal deseado, adaptar el número de columnas, sus dimensiones y las alturas de gel.

En un ejemplo particular, y especialmente para la preparación de un concentrado de inmunoglobulinas directamente a partir de criosobrenadante, se utiliza ventajosamente una cromatografía multicolumna de afinidad.

Se sabe que la mayoría de los geles de afinidad (que forman la fase estacionaria de la cromatografía de afinidad), especialmente los utilizados industrialmente, poseen una capacidad de carga máxima en inmunoglobulinas (Ig) de cuatro a cinco veces más débil que un gel de intercambio de iones (20-30 g.l⁻¹ frente a 80-100 g.l⁻¹). Por lo tanto, se admite generalmente que para tratar volúmenes de plasma elevados, la cantidad de gel de afinidad a utilizar es tal que su utilización es económicamente inadecuada.

Sin embargo, la solicitante ha descubierto que esta desventaja puede contrarrestarse fraccionando la columna de cromatografía en varias columnas más pequeñas y especialmente en 3 a 8 columnas, preferiblemente 3 a 5 columnas. La utilización de una pluralidad de columnas de cromatografía permite colocar en serie de una(s) columna(s) principal(es) unas columnas de protección que capturarán las proteínas plasmáticas de interés que han escapado de la(s) columna(s) principal(es) durante una carga de la proteína de interés. Los ligandos de afinidad presentes en esta(s) columna(s) principal(es) quedan entonces saturados de manera que se alcanza la capacidad máxima del gel de cromatografía. Esta(s) columna(s) se extrae(n) después del circuito para ser eluirse separadamente y permitir la recuperación de las proteínas de interés. Las columnas de protección se vuelven a su vez la(s) columna(s) principal(es). Unos ciclos sucesivos en número de 3 a 50, preferiblemente de 5 a 30 y de manera preferida de 7 a 15, permiten maximizar la utilización de los ligandos de afinidad y así reducir el volumen total de gel necesario para la captura y la elución de la molécula de interés.

Ventajosamente, el ligando de afinidad se selecciona entre los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos, los derivados de anticuerpos o unos ligandos químicos tales como unos péptidos, unos péptidos miméticos, unos peptoides, unas nanofitinas o también unos ligandos oligonucleotídicos tales como los aptámeros.

Por ejemplo, se puede utilizar un gel que comprende una matriz de agarosa reticulada, que permite trabajar con caudales elevados, en combinación con un ligando de afinidad apto para fijar la proteína de interés. En un modo de realización particular, el ligando de afinidad permite unir el fragmento Fc de las Ig humanas o cualquier otra secuencia conservada dentro de las inmunoglobulinas.

En un modo de realización particular, el ligando de afinidad utilizado es una proteína recombinante que reconoce el fragmento Fc de las Ig y acoplada a una matriz, por ejemplo el gel IgSelect de GE Healthcare.

Ventajosamente, el ligando se puede seleccionar de manera que reconozca específicamente una clase de inmunoglobulinas (por ejemplo las inmunoglobulinas G) y/o reconocer específicamente una o varias sub-clase de inmunoglobulinas (por ejemplo IgG1) u/o IgG2 y/o IgG3 y/o IgG4). En otro modo de realización particular, el ligando de afinidad utilizado es la proteína G, que posee una afinidad para las IgG y no presenta ventajosamente afinidad para las IgA. En también otro modo de realización particular, el ligando de afinidad utilizado es la proteína A que une específicamente las IgG1, IgG2 e IgG4 pero no permite capturar las IgG3.

En un ejemplo de realización particular, el ligando de afinidad de la cromatografía multicolumna de afinidad presenta una afinidad para las inmunoglobulinas G, y se selecciona ventajosamente entre los ligandos que presentan una afinidad para las IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Más particularmente, el concentrado de IgG obtenido según el procedimiento de la invención presenta ventajosamente un perfil de repartición de las sub-clases de IgG similar al del plasma. Especialmente, el concentrado de IgG según la invención comprende ventajosamente entre el 50 y el 70% de IgG1, del 25 al 35% de IgG2, del 2 al 8% de IgG3 y del 1 al 8% de IgG4 o de manera aún más preferida entre el 60 y el 70% de IgG1, del 30 al 35% de IgG2, del 3 al 6% de IgG3 y del 2 al 5% de IgG4. En un modo de realización particular, el concentrado obtenido según el procedimiento de la invención puede presentar una baja disminución de las sub-clases IgG3 y/o IgG4 con respecto al plasma, mientras que el producto sigue siendo, no obstante, comparable en eficacia terapéutica a un producto que tiene una gama de sub-clases de IgG similar a la del plasma.

En otro ejemplo de realización particular, el ligando de afinidad de la cromatografía multicolumna de afinidad presenta una afinidad para el fibrinógeno o la albúmina. Más particularmente, la invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación de concentrados de albúmina y/o de fibrinógeno humano directamente a partir de plasma sanguíneo, según el cual se somete dicho plasma o el sobrenadante de plasma crioprecipitado a una cromatografía multicolumna de afinidad en la que el o los ligandos de afinidad presentan una afinidad por el fibrinógeno y/o la albúmina. El ligando utilizado puede, especialmente, ser cualquier ligando comercialmente disponible, por ejemplo el ligando de afinidad CaptureSelect (HSA (Life Technologies) o el ligando de la matriz de afinidad CaptureSelect Fibrinogen (Life Technologies).

De manera ventajosa, el ligando de afinidad tal como se selecciona para el procedimiento de la invención es resistente a las condiciones de saneamiento y/o reutilización intensiva compatibles con un uso industrial. En un modo de realización particular, el ligando de afinidad se selecciona también ventajosamente entre los péptidos y/o peptoides (procedentes de biología combinatoria, tal como el "phage display"), las nanofitinas (extraídas de bacterias extremófilas) y/o los aptámeros.

En un ejemplo particular, el ligando de afinidad es un aptámero, y especialmente un aptámero nucleico. El término "aptámero" tal como se utiliza aquí designa una molécula de ácido nucleico monocatenario, ADN o ARN, y especialmente una molécula de ácido nucleico monocatenario capaz de unirse de manera específica a la proteína de interés, por ejemplo a una inmunoglobulina uniéndose al fragmento Fc de las Ig humanas o a las secuencias conservadas de la inmunoglobulina. Ventajosamente, el aptámero se puede seleccionar de manera que reconozca específicamente una clase de inmunoglobulina (por ejemplo las inmunoglobulinas G) y/o reconozca específicamente una o varias subclases de inmunoglobulina (por ejemplo IgG1 y/o IgG2 y/o IgG3 y/o IgG4). Los aptámeros comprenden generalmente entre 5 y 120 nucleótidos y pueden seleccionarse *in vitro* según un procedimiento

conocido bajo el nombre de SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Por "aptámero nucleico" se entiende, según la invención, un ácido nucleico monocatenario, y especialmente ácido nucleico monocatenario que se une específicamente al fragmento Fc de las IgG humanas.

- 5 Los aptámeros presentan numerosas ventajas. Por su naturaleza oligonucleotídica, los aptámeros poseen una baja inmunogenicidad y una resistencia importante a condiciones fisicoquímicas astringentes (presencia de DMSO, de un pH muy ácido o muy básico, utilización de disolventes orgánicos o de temperatura elevada) que permite estrategias de saneamiento variadas en el ámbito de un uso como ligando de afinidad. Es así posible aumentar la vida útil de los geles de afinidad procediendo a etapas de saneamiento para limpiar las columnas de cromatografía y
- 10 limitar su ensuciamiento y reducir los riesgos de contaminación viral o priones, y esto a pesar de los múltiples ciclos y las cargas aumentadas con respecto a una cromatografía clásica. Los aptámeros, gracias a su estructura de tipo ácido nucleico, están particularmente adaptados a las desinfecciones a pH básico, permitiendo reutilizaciones de 100 a 200 ciclos.
- 15 La solicitud de patente FR 2 970 003, a nombre de la solicitante, describe unos procedimientos de fabricación de soportes de afinidad con unos aptámeros nucleicos inmovilizados. Especialmente, esta solicitud describe un procedimiento de inmovilización de ácidos nucleicos que comprenden al menos una función amina reactiva, por injerto sobre un soporte sólido que presenta en su superficie unos grupos ácidos carboxílicos activados.
- 20 En un modo de realización particular, la cromatografía multicolumna puede aplicarse ventajosamente a una o varias etapas de purificación sucesivas, utilizando unas columnas de cromatografía sucesivas. Así, la fracción no retenida de la primera cromatografía multicolumna se puede utilizar para purificar las otras proteínas plasmáticas de interés en el orden más apropiado. En un ejemplo de realización particular, una primera cromatografía multicolumna se realiza a partir de plasma sanguíneo o de crioprecipitado para purificar las inmunoglobulinas. La fracción de plasma
- 25 procedente de esta primera purificación se somete a una segunda cromatografía multicolumna para purificar la albúmina. La fracción de plasma procedente de esta segunda cromatografía multicolumna, agotada de inmunoglobulinas y de albúmina, puede después someterse a una tercera cromatografía multicolumna para purificar el fibrinógeno, etc. Es posible especialmente tratar el plasma en flujo continuo, para purificar de forma continua la inmunoglobulina, la albúmina y/o el fibrinógeno en particular, sin activar la cascada de coagulación.
- 30 En otro ejemplo de realización particular, una primera cromatografía multicolumna se realiza a partir de plasma sanguíneo o de crioprecipitado para purificar las inmunoglobulinas. La fracción de plasma procedente de esta primera purificación se somete a una segunda cromatografía multicolumna para purificar el fibrinógeno. La fracción de plasma procedente de esta segunda cromatografía multicolumna, agotada de inmunoglobulinas y de fibrinógeno,
- 35 puede someterse después a una tercera cromatografía multicolumna para purificar la albúmina, etc. Es posible especialmente tratar el plasma en flujo continuo, para purificar de forma continua la inmunoglobulina, el fibrinógeno y/o la albúmina especialmente, sin activar la cascada de coagulación.
- Según la invención, el procedimiento de preparación de concentrados de proteínas plasmáticas humanas de uso terapéutico puede también comprender al menos una de las etapas siguientes:
- 40 (i) una etapa de inactivación viral o de eliminación viral;
- (ii) una etapa de cromatografía de intercambio de iones;
- 45 (iii) una etapa de eliminación de anticuerpos anti-A y anti-B, especialmente por cromatografía de afinidad;
- (iv) una etapa de precipitación con ácido caprílico y/o caprilato;
- 50 (v) una etapa de concentración por ultrafiltración;
- (vi) una etapa de formulación.
- Ventajosamente, el procedimiento de preparación según la invención permite obtener un concentrado de proteínas humanas de uso terapéutico y puede comprender al menos una etapa ulterior entre las etapas (i) a (vi).
- 55 En un ejemplo de realización particular, el procedimiento de preparación permite obtener un concentrado de inmunoglobulinas humanas de uso terapéutico, que comprende eventualmente una o varias etapas ulteriores entre las etapas (i) a (vi).
- 60 En otro ejemplo de realización particular, el procedimiento de preparación permite obtener un concentrado de albúmina de uso terapéutico, que comprende eventualmente una o varias etapas ulteriores entre las etapas (i) a (vi).
- En otro ejemplo de realización particular, el procedimiento de preparación permite obtener un concentrado de fibrinógeno de uso terapéutico, que comprende eventualmente una o varias etapas ulteriores entre las etapas (i) a (vi).
- 65

Por ejemplo, el concentrado de proteínas plasmáticas humanas y/o el concentrado de inmunoglobulinas obtenido sometiendo directamente un plasma sanguíneo o un criosobrenadante a una cromatografía multicolumna, de afinidad o intercambiadora de aniones especialmente, puede ventajosamente sufrir al menos una etapa de eliminación o de inactivación de al menos un agente infeccioso.

Entre los agentes infecciosos en cuestión en la etapa (i), se pueden citar los virus y los ATNC (agentes transmisibles no convencionales) como el prion.

Una inactivación viral comprende frecuentemente un tratamiento con unos productos químicos, por ejemplo por disolvente, y/o detergente y/o por el calor (pasteurización y/o calentamiento en seco) y/o por irradiación (Gamma y/o por UVC) y/o por tratamiento pH (tratamiento a pH ácido).

Preferentemente, la etapa (i) según la invención comprende al menos un tratamiento por disolvente y detergente. El tratamiento por disolvente y detergente (denominado generalmente tratamiento Disolvente/Detergente o S/D) comprende especialmente el tratamiento con tri-n-butilfosfato (TnBP) y/o un detergente que se selecciona entre el Triton X-100, el Tween (preferentemente el Tween 80), el colato de sodio y el 2-[4-(2,4,4-trimetilpentano-2-il)fenoxi]etanol (Octoxinol).

Se puede utilizar también la nanofiltración para eliminar los agentes infecciosos, en particular los virus y los ATNC. En el caso de las proteínas plasmáticas, la nanofiltración se refiere generalmente a la filtración del concentrado de proteínas de interés a través de un filtro con un tamaño de poros inferior a 80 nm. Los filtros disponibles son, por ejemplo, los filtros BioEx, Planova® 75 nm, Planova® 35 nm, Planova® 20 nm o Planova® 15 nm (Asahi corporation), Ultipor DV 50 or DV 20 (Pall corporation), Virosart CPV (Sartorius), Viresolve NFR o NFP (Millipore). La nanofiltración puede efectuarse ventajosamente sobre un filtro único o sobre varios filtros en serie de porosidad idéntica o decreciente.

La eliminación de los agentes infecciosos puede también realizarse mediante una filtración en profundidad. Los filtros disponibles son, por ejemplo, unos filtros compuestos de celulosa regenerada, en los que se pueden haber añadido unos adyuvantes de filtración (tales como celite, perlita o tierras de Kieselguhr) comercializados por Cuno (filtres Zeta+ VR series), Pall-Seitz (P-series Depth Filter) o Sartorius (Virosart CPV, Sartoclear P depth filters).

En un modo de realización particular, se puede realizar ventajosamente una etapa de inactivación viral directamente sobre el plasma o el sobrenadante de plasma crioprecipitado o el crioprecipitado de plasma resuspendido, a fin de que el conjunto de las proteínas a purificar se beneficien del tratamiento previo de la cromatografía multicolumna.

En otro modo de realización particular, el plasma bruto y/o el sobrenadante de plasma crioprecipitado y/o el crioprecipitado de plasma resuspendido, pueden someterse a una filtración en profundidad o a una secuencia de filtración, por ejemplo sobre un filtro de polipropileno o medio equivalente de 6 µm, 1 µm, después 0,45 – 0,2 µm, antes de la cromatografía multicolumna. Tal etapa preliminar permite ventajosamente prevenir y/o reducir un ensuciamiento prematuro de las columnas utilizadas para la cromatografía multicolumna. En otro modo de realización particular, el o los filtros de profundidad utilizados son unos filtros de profundidad de eliminación de lípidos (por ejemplo Cuno o Pall-Seitz) que permiten una reducción de los lípidos en la fracción plasmática tratada.

Ventajosamente, la etapa (i) de inactivación o eliminación viral está seguida de una etapa (ii) de cromatografía de intercambio de iones.

En un ejemplo particular, la etapa (ii) de cromatografía de intercambio de iones es una cromatografía de intercambio de aniones o de cationes. Tales etapas de cromatografía de intercambio de aniones o de cationes se describen en las solicitudes de patente EP 0 703 922 y WO 99/64462 a nombre de la solicitante.

En un ejemplo particular, la etapa (ii) de cromatografía de intercambio de aniones se puede realizar sobre un gel de polisacárido reticulado o de polímero vinílico o acrílico, injertado de grupos DEAE o TMAE o QAE, como se describe en las solicitudes de patente WO2002/092632 y WO2013/007740 a nombre de la solicitante.

En otro ejemplo particular, la cromatografía multicolumna de intercambio de aniones y/o en modo mixto se realiza sobre una matriz de alta tolerancia a la sal que permite capturar la proteína plasmática en un medio que tiene una salinidad elevada, tal como el plasma o la fracción no retenida de una cromatografía. Ventajosamente, la cromatografía multicolumna de intercambio de aniones y/o modo mixto de alta tolerancia a la sal se realiza sobre el gel STAr AX de PALL BIOSEPPA, Capto MMC de GE Healthcare o le gel ESHMUNO HCX de Merck o cualquier gel equivalente conocido por el experto en la materia.

Especialmente, para la preparación de un concentrado de inmunoglobulinas de uso terapéutico, la etapa (ii) de cromatografía de intercambio de aniones puede comprender:

- el ajuste a un pH de 8 a 10 de la solución que ha sufrido el tratamiento con disolvente-detergente (etapa (i));

- su carga sobre la columna de cromatografía previamente equilibrada en tampón a pH 8 a 10, lo que permite la adsorción de las inmunoglobulinas y el paso de las proteínas no adsorbidas en el efluente;

5 - un lavado por el mismo tampón hasta eliminación de todas las proteínas no adsorbidas y de la mezcla disolvente detergente;

- y la elución de las inmunoglobulinas por un tampón apropiado.

10 Esta elución se puede realizar por un tampón fosfato a pH comprendido entre 4 y 7, y preferentemente a pH de 6,2 para eluir las inmunoglobulinas.

El procedimiento según la invención puede también comprender una etapa (iii) de eliminación de anticuerpos anti-A y/o anti-B. En un ejemplo particular, la etapa (iii) de eliminación de anticuerpos anti-A y/o anti-B se realiza en la solución obtenida al final de la etapa (ii). Esta etapa puede, por ejemplo, efectuarse según el método descrito en la solicitud de patente WO 2007/077365 a nombre de la solicitante. Así, en el caso de la preparación de un concentrado de inmunoglobulinas de uso terapéutico, la solución obtenida en la etapa (ii) puede someterse a una etapa de eliminación de los anticuerpos anti-A y anti-B por cromatografía de inmunoafinidad por percolación de dicho concentrado de inmunoglobulinas polivalentes sobre un soporte cuya matriz está injertada con grupos oligosacáridos antigénicamente similares a los grupos sanguíneos A y/o B, o sobre una mezcla de soportes cuyas matrices están injertadas con grupos oligosacáridos antigénicamente similares a los grupos sanguíneos A y/o B. En un modo de realización particular, la etapa (iii) de eliminación de anticuerpos anti-A y/o anti-B se realiza sobre una cromatografía multicolumna de afinidad.

25 En algunos casos, el procedimiento según la invención puede comprender una etapa (iv) de precipitación con ácido caprílico y/o caprilato. De manera general, la adición de ácido caprílico y/o caprilato, en medio ligeramente ácido permite precipitar las proteínas plasmáticas, con la excepción de las Ig que se quedan en el sobrenadante. Según la invención, es posible proceder a esta etapa (iv) de precipitación caprílica antes o después de la etapa de purificación por cromatografía multicolumna.

30 En un ejemplo de realización particular, la etapa de purificación de la proteína plasmática de interés por cromatografía multicolumna intercambiadora de aniones, está seguida de una etapa ulterior de precipitación con ácido caprílico y/o caprilato. Tal combinación cromatográfica multicolumna intercambiadora de iones/precipitación con ácido caprílico puede ser particularmente ventajosa para la preparación de un concentrado de Ig (y muy particularmente de IgG) y/o un concentrado de albúmina y/o fibrinógeno.

35 En particular, para la preparación de un concentrado de inmunoglobulinas de uso terapéutico, la etapa (iv) de precipitación con ácido caprílico puede comprender las etapas que consisten en

40 - eventualmente añadir el pH de la fracción plasmática a un valor comprendido entre 3,0 y 6,0, preferiblemente a pH 4;

- añadir el ácido caprílico a la fracción plasmática;

45 - centrifugar o filtrar para recuperar el sobrenadante enriquecido en IgG.

El procedimiento según la invención puede comprender ventajosamente una o varias etapas (v) de concentración por ultrafiltración. Por ejemplo, durante la preparación de un concentrado de Ig, es posible someter la fracción enriquecida en Ig, procedente de la etapa de cromatografía multicolumna, eventualmente previamente sometida a una y/u otra de las etapas (i) a (iv), a una ultrafiltración sobre membrana.

50 Es también posible prevenir una etapa (vi) de adición de uno o varios estabilizantes farmacéuticamente aceptables al concentrado de proteínas plasmáticas humanas. Según la invención, es posible prever una etapa (i) de seguridad viral adicional, por nanofiltración, antes de la etapa (vi) de formulación.

55 Por estabilizantes farmacéuticamente aceptables, se entienden las formulaciones adaptadas a los concentrados de proteínas plasmáticas, especialmente los excipientes tales como los descritos en las solicitudes FR 03 08403, y preferiblemente las formulaciones adaptadas a los concentrados de inmunoglobulinas, y especialmente los excipientes tales como los descritos en las solicitudes FR 03 04388, FR 08 59117, FR 10 54721, FR 10 55825 a nombre de la solicitante.

60 La etapa (vi) de formulación puede eventualmente ir seguida de una etapa (vii) de congelación o de liofilización de dicha preparación farmacéutica obtenida en la etapa (vi).

65 Ventajosamente, el procedimiento según la invención permite la preparación de concentrados de inmunoglobulinas, y/o de fibrinógeno y/o de albúmina, especialmente evitando unas etapas de almacenamiento en frío.

Ventajosamente, el procedimiento según la invención permite la obtención de un concentrado de inmunoglobulinas con un rendimiento superior a 5 g.l-1 de plasma, de manera preferida con un rendimiento superior a 6 g.l-1 de plasma. De manera muy ventajosa, el procedimiento según la invención se ha optimizado a fin de obtener un rendimiento en inmunoglobulinas próximo de 7-8 g.l-1 de plasma inicial.

De manera ventajosa, el procedimiento según la invención permite la obtención de un concentrado de albúmina con un rendimiento superior a 30 g.l-1, de manera muy ventajosa superior a 35 g.l-1. En lo que se refiere al fibrinógeno, siendo el porcentaje plasmático del orden de 3 g/l, una etapa de captura por afinidad permite ventajosamente capturar el 80% en una etapa. De manera preferida, la cromatografía continua permite alcanzar unos rendimientos superiores al 90%.

De manera ventajosa, el concentrado de inmunoglobulinas obtenido por el procedimiento según la invención posee un repertorio antigénico similar o idéntico al repertorio antigénico del plasma. En un modo de realización particular, el concentrado de inmunoglobulinas obtenido por el procedimiento según la invención posee un repertorio antigénico similar y/o superior al repertorio antigénico de los concentrados de la técnica anterior. En efecto, las pérdidas limitadas en inmunoglobulinas durante el procedimiento según la invención permiten ventajosamente conservar una distribución de las inmunoglobulinas similar a la del plasma y conservar un panel antigénico amplio.

El procedimiento según la invención es así particularmente ventajoso para la producción de fracciones de inmunoglobulinas dirigidas contra una diana antigénica específica.

Asimismo, el procedimiento según la invención es particularmente interesante para la preparación de un concentrado de albúmina, especialmente a partir de una fracción plasmática ya agotada de inmunoglobulinas. La etapa de cromatografía multicolumna según la invención permite un rendimiento de captura de más del 90%. Mientras que la capacidad del gel durante una etapa de cromatografía clásica está generalmente comprendida entre 25 y 30 g/l de gel, la utilización de una cromatografía multicolumna intercambiadora de aniones o interacciones hidrófobas o una combinación de ligandos químicos (multi-modal) según la invención permite obtener una capacidad de más de 50 g/l de gel, es decir una saturación total de la capacidad dinámica del soporte.

Los **ejemplos** siguientes ilustran la invención, sin no obstante limitar su alcance.

Ejemplo 1: Preparación de concentrados de inmunoglobulinas por cromatografía multicolumna de afinidad a partir de crio-sobrenadante

Material y método

Crio-sobrenadante

Dos lotes de aproximadamente 5 l de criosobrenadante de plasma humano (lotes 13500-13L-06002 y 13500-13L-06007) que comprenden entre 8 y 10 g/l-1 de IgG se distribuyen en alícuotas en fracciones de 700 ml y después se congelan a -80°C. Las características de los lotes utilizados se reproducen en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1: Distribución de las subclases de IgG en los criosobrenadantes

Materia prima	N° de lote	IgG Totales (%)	IgG1 (%)	IgG2 (%)	IgG3 (%)	IgG4 (%)
Criosobrenadante	13L06002	100,0	57,9	32,0	3,5	6,6
Criosobrenadante	13L06007	100,0	57,2	32,3	4,0	6,6

Durante un ensayo, el volumen necesario de criosobrenadante se descongela durante 20-30 minutos en un baño maría a 37°C sin que el producto supere la temperatura interna de 25°C.

Solución tampón

La composición de las soluciones tampón utilizadas durante diferentes etapas del procedimiento de cromatografía de afinidad se resumen en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2: Soluciones tampón para la cromatografía de afinidad

Fases	Composición	Valores diana
Equilibrado y Lavado	Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O:16,7mM	pH=7,4
	NaH ₂ PO ₄ , 2 H ₂ O: 3,34 mM	
	NaCl 150 mM	
Elución	Glicina 0,1M	pH=3
Ajuste del eluato	Glicina 0,1M	pH=11

La composición de soluciones tampón utilizadas durante diferentes etapas del procedimiento de cromatografía de intercambio de iones se resume en la tabla 3 siguiente.

5 Tabla 3: Soluciones tampón para la cromatografía a intercambio de iones.

Fases	Composición	Valores diana
Pre-equilibrado	Glicina, NaCl	<i>pH: 9,0 +/- 0,1</i>
		<i>conductividad: 8,5 +/- 0,5 mS/cm</i>
Equilibrado y Lavado	Glicina, NaCl	<i>pH: 9,0 +/- 0,1</i>
		<i>conductividad: 1000 +/- 100 µS/cm</i>
Elución	Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O:	<i>pH: 6,2 +/- 0,1</i>
	NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	<i>conductividad: 1600 +/- 100 µS/cm</i>

Geles de cromatografía

10 Para la cromatografía de afinidad, se utiliza un gel Ig Select® de GE Healthcare (lotes n°10035817 y n° 10017479). El ligando de afinidad utilizado es un ligando de la compañía BAC (BioAffinityCompany), que fija específicamente el fragmento Fc de las IgG humanas. Este ligando es una proteína recombinante de 14 kD, acoplada a la base de la matriz por un largo brazo carbonado de separación (spacer) que facilita la adsorción de las Ig. Este está acoplado al separador por medio de uniones amida multipunto.

15 Para la cromatografía intercambiadora de iones, se utiliza un gel intercambiador de aniones fuerte Fractogel® EMD TMAE (lote n° 09L03583). Este gel está constituido de una resina polimetacrilato reticulada sobre la cual se injertan unos grupos de trimetilaminoetilo (TMAE).

20 Columnas

Para la cromatografía de afinidad multicolumna, se utilizaron de 3 a 5 columnas radiales de la compañía Proxycs, referenciadas µ-RFC 5.0-6.0 (lote 1303B014 – Volumen de gel: 10 ml; altura de gel: 12 cm proporción diámetro de entrada/diámetro de salida: 2/1) en combinación con un autómata BioSc Lab (Novasep).

25 Para la cromatografía TMAE, se utilizó una columna XK 16 (GE healthcare) volumen de gel 41 ml de altura 20,4 cm, y superficie 2,0 cm² con un autómata AKTA Purifier 10 (GE healthcare).

Ultrafiltración

30 Se utiliza un casete Millipore Biomax 30 (PES) con un cut-off de 30 kDa y una superficie de 50 cm² (referencia C1PA45544).

Filtración esterilizante

35 Se utilizan unos filtros Sartorius Minisart de 5 cm² de superficie que presentan una porosidad de 0,45 µm y 0,2 µm (referencias 16537 y 16532).

Ensayos

40 Cromatografía de afinidad multicolumna

Los ensayos se llevaron a cabo sobre 4 columnas, conectadas de manera secuencial en serie durante fases de adsorción y lavado del gel, con una carga de 26 g de IgG.I-1 de gel, un tiempo de contacto de 5 minutos, a un pH de fijación comprendido entre 7,3 y 7,8, realizándose la elución con una solución de glicina 0,1M pH 3.

El gel se regeneró después de cada cromatografía.

La regeneración consistió en pasar 2 VC de solución de cloruro de sodio 2M.

50 El seguimiento de la cromatografía se realizó mediante registro de la DO a 280 nm y mediante el cálculo del rendimiento en IgG (determinación por nefelometría).

55 El caudal de trabajo era de 2,3 ml.min⁻¹, lo que corresponde a un tiempo de contacto de 2 minutos durante la adsorción.

El desarrollo de las etapas de la cromatografía de afinidad multicolumna se resume en la tabla 4 siguiente.

Tabla 4: etapas de la cromatografía de afinidad multicolumna

Etapas	Solución	Volumen	Remarques
Equilibrado	Tampón	Al mínimo	Verificación del pH (7,4 ± 0,2)
	Equilibrado	2VC	
Adsorción	Criosobrenadante	3 ml a 22 ml según el ensayo	Recogida de la fracción no adsorbida por seguimiento de la DO 280 nm
Lavado	Tampón	2 a 4 VC	Hasta volver a la línea de base
	Equilibrado		
Elución	Glicina 0,1M	2 VC	Recogida hasta volver a la línea de base.
	pH 3,0		
Regeneración	NaCl 2 M	2 VC	/
Reequilibrado de la columna	Tampón	Al mínimo	Verificación del pH (7,4 ± 0,2)
	Equilibrado	2VC	
Almacenamiento	Etanol 20%	Al mínimo	No realizado si se reutiliza inmediatamente la columna
		2VC	

VC: volumen columna

Tratamiento S/D y cromatografía TMAE

5 Se efectúa un tratamiento S/D durante aproximadamente 30 minutos para inactivar los virus envueltos. El producto se ajusta después en pH y en conductividad antes de la inyección sobre gel TMAE.

10 La fracción no adsorbida del gel TMAE se recupera después (fracción eliminada), tras la vuelta a la línea de base y el lavado de la columna, el eluato del gel se recupera para la fase siguiente.

Ultrafiltración

15 La etapa de ultrafiltración permite dializar y concentrar el eluato de la columna TMAE a una concentración intermedia de 80-120 l-1.

Formulación

20 El producto se ha formulado por adición del tampón de formulación (manitol, glicina, polisorbato 80). La concentración del producto final se ajusta a 50 g.l-1.

El producto obtenido se filtra estérilmente sobre una secuencia de filtros 0,45 y 0,22 µm. Después se muestrea y se conserva en estado líquido a temperatura de 4,0 – 7,0°C.

Resultados

Los análisis se realizaron sobre el producto final a fin de compararlos a una inmunoglobulina IgG a 50 G/litro, (producto de referencia) obtenida según un procedimiento que tiene en primeras etapas de purificación un fraccionamiento por etanol.

30 - Análisis de las IgG totales y sub-clases por nefelometría (tabla 6).

- Análisis de las IgA, IgM e IgE por ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas" (tabla 7).

35 Tabla 5: Distribución de las sub-clases de IgG

Ensayo	IgG totales (%)	IgG1 (%)	IgG2 (%)	IgG3 (%)	IgG4 (%)
Producto final (Charge IgSelect 26 g.l-1)	100,0	53,4	33,4	1,2	1,7
Producto de Referencia	100,0	59,7	36,8	2,4	1,9

Tabla 6: Análisis del contenido en proteínas contaminantes

Ensayo	Ig G	Ig A	Ig M	Ig E
	(g.l-1)	(mg.l-1)	(mg.l-1)	(UI.ml-1)
Producto final (Carga IgSelect 26 g.l-1)	57,6	< 13	< 8	1,5
Producto de Referencia	46,1	8,5	<8	<0,8

40 Se constata que estas condiciones de purificación de las IgG directamente a partir de criosobrenadante dan un producto de calidad equivalente al producto de referencia. Además, como se indica en la tabla 6 anterior, se observa una conservación de todas las sub-clases de IgG, con una distribución que se acerca a la del plasma.

De manera más interesante, la cromatografía multicolumna de afinidad que utiliza el gel IgSelect tiene un rendimiento de etapa superior al 90%, y se recuperaron 7,4 g de IgG por litro de criosobrenadante. Se constata un agotamiento completo de la IgG en la fracción no adsorbida del gel de afinidad.

Tabla 7: Rendimiento de afinidad para las multicolumnas Ig Select

Ensayo de Carga de IgSelect 26 g/L	Ig G (g.l-1)	Volumen (l)	Ig G (mg)	Rendimiento de la Etapa (%) / g IgG por litro de plasma
Criosobrenadante	8,0	880	6500	100/8,0
Eluato afinidad de Ig Select multicolumna	4,8	1245	6010	92,6/7 ,4

En conclusión, la purificación de las IgG directamente a partir de criosobrenadante de plasma por cromatografía multicolumna se puede considerar perfectamente a escala industrial, especialmente para tratar unos volúmenes de varios miles de litros de plasma por día.

Por ejemplo, para el tratamiento de un lote industrial de 4500 l de plasma humano, se pueden utilizar 4 columnas de 50 l y de 12 cm de altura de gel, con una carga en criosobrenadante que corresponde a 27 g de IgG por litro de gel, un caudal lineal de adsorción comprendido entre 100 y 300 cm.h-1, y un caudal lineal para las etapas de lavado del gel y de elución superior, comprendido entre 200 y 600 cm/hora. Pueden considerarse configuraciones compuestas de 3 columnas de 70 litros de gel, o de 5 columnas de 40 litros de gel, determinándose el número de ciclos a realizar para tratar la totalidad del lote en función del volumen de materia prima aplicado.

Tal realización, incluso a escala industrial, permite obtener un concentrado de inmunoglobulinas que responde a los requisitos reglamentarios y que poseen todas las cualidades requeridas para una utilización farmacéutica (pureza, seguridad biológica, distribución de las sub-clases de IgG, etc.). Especialmente se observa una conservación de las cuatro sub-clases de IgG del plasma. A fin de eliminar la mezcla disolvente/detergente, las IgA y las IgE, se puede considerar después una cromatografía TMAE.

Por otro lado, es posible prever una etapa de lavado del gel con polisorbato al 80%, bien simultáneamente a la pre-elución con NaCl, o bien en mezcla en la fracción de urea/ácido acético.

Ejemplo 2: Captura de inmunoglobulinas por cromatografía multicolumna de afinidad a partir de plasma

Material y método

Se han descongelado unas bolsas de plasma humano que han permitido constituir un grupo de plasma de aproximadamente 30 l que comprende entre 8 y 10 g/l-1 de IgG, en un baño maría a 37°C sin que el producto supere la temperatura interna de 25°C a fin de extraer las inmunoglobulinas por una primera cromatografía multicolumna.

Tabla 8: Distribución de las subclases de IgG en los grupos de plasma

Materia prima	Ensayo N°	IgG Totales (%)	IgG1 (%)	IgG2 (%)	IgG3 (%)	IgG4 (%)
Grupo de plasma 1	1647-120	100,0	58,0	33,6	3,3	5,2
Grupo de plasma 2	1647-121B	100,0	57,4	32,5	3,4	6,7

Solución tampón

La composición de las soluciones tampón utilizadas durante diferentes etapas del procedimiento de cromatografía de afinidad se resume en la tabla 2 siguiente.

Tabla 9: Soluciones tampón para la cromatografía de afinidad

Fases	Composición	Valores diana
Equilibrado y Lavado	Citrato de sodio 10,0 mM,	pH=7,4
	NaCl 100 mM	
Pre-elución	Citrato de sodio 10 mM,	pH 7,4
	NaCl 2,0 M	
Elución	Ácido acético	CSP pH=3,0
Ajuste del eluato	Hidróxido sódico 1 M	CSP pH 4,8

Gel de cromatografía

Para la cromatografía de afinidad, se utiliza un gel de afinidad CaptureSelect FcXL de la compañía Life Technologies (Ref. 19432801L, lote n° 200814-03). El ligando de afinidad es un ligando de la compañía BAC (BioAffinityCompany), que fija específicamente el dominio CH3 de las 4 subclases de las IgG humanas. Este ligando es una proteína recombinante de 14 kD.

Columnas

Para la cromatografía de afinidad multicolumna, se utilizaron 4 columnas radiales de la compañía Proxycys, (MD 122 MK III - Volumen de gel: 250 ml por columna para un volumen total de gel de afinidad de 1,0 l de gel; altura de gel: 12 cm; proporción diámetro de entrada/diámetro de salida: 2/1) en combinación con un autómatas Pilote BioSc M (Novasep).

Ensayos

Cromatografía de afinidad multicolumna

Los ensayos se llevaron a cabo sobre 4 columnas, controladas de manera secuencial por el autómatas con una carga en plasma que corresponde a 21 g de IgG.I-1, un tiempo de contacto de 3 a 4 minutos, a pH de adsorción del plasma no modificado comprendido entre 7,1 y 7,8, realizándose la elución con una solución de ácido acético a pH 3,0. El gel se ha regenerado después de cada cromatografía.

El seguimiento de la cromatografía se realizó mediante registro de la DO a 280 nm y mediante el cálculo del rendimiento en IgG sobre el grupo de los eluatos (análisis por nefelometría). El desarrollo de las etapas de la cromatografía de afinidad multicolumna se resume en la tabla 10 siguiente.

Tabla 10: Etapas de cromatografía de afinidad multicolumna

Etapas	Solución	Notas
Equilibrado	Tampón	(7,4 ± 0,2)
	Equilibrado	
Adsorción	Plasma filtrado 0,2 µm	Recogida de la fracción no adsorbida
Pre-elución	Citrato de sodio 10 mM, NaCl 2 M	
Elución	Ácido acético pH 3,0	Recogida hasta volver a la línea de base.

A fin de limitar los riesgos de agregación de las IgG a pH demasiado ácido, los eluatos de las columnas de afinidad obtenidos se ajustaron a pH 4,8 con la ayuda de una solución de hidróxido de sodio 1 M.

Diafiltración de la concentración del eluato de cromatografía de afinidad FcXL multicolumna

El eluato se sometió a diafiltración en agua y se concentró en una membrana que tiene un umbral de corte de 30 kDa a fin de obtener una concentración de aproximadamente 70 g/l.

Resultados

Los análisis se realizaron sobre el eluato de la cromatografía multicolumna concentrado por ultrapurificación.

- análisis de las IgG totales y sub-clases por nefelometría (tabla 11).

- análisis de las IgA, IgM e IgE por ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) (tabla 12).

Tabla 11: Distribución de las subclases de IgG realizada después de la ultrafiltración y concentración de los eluatos.

Ensayo	IgG totales (%)	IgG1 (%)	IgG2 (%)	IgG3 (%)	IgG4 (%)
Eluato FcXL: plasma 1	100,0	58,3	32,9	3,0	5,7
Eluato FcXL plasma 2	100,0	58,5	34,0	2,2	5,3

Tabla 12: Análisis del contenido en proteínas contaminantes realizado después de la ultrafiltración y de la concentración de las IgG

Ensayo	Ig G (g.l-1)	Ig A (g.l-1)	Ig M (g.l-1)	Ig E (UI.ml-1)
Eluato FcXL: plasma 1	76,6	1,00	0,75	33,0
Eluato FcXL plasma 2	66,8	0,80	0,50	12,0

Se constata que estas condiciones de purificación de las IgG directamente a partir de plasma dan un producto de muy buena calidad. Además, como se indica en la tabla 11 anterior, se observa una conservación de todas las sub-clases de IgG, con una distribución que se parece a la del plasma.

- 5 De manera más interesante, la cromatografía multicolumna de afinidad que utiliza el gel FcXL tiene un rendimiento de etapa superior al 90%, es decir superior a 7,5 g de IgG recuperados por litro de plasma utilizado. Se constata un agotamiento completo de IgG en la fracción no adsorbida del gel de afinidad. Además, la albúmina y el fibrinógeno se recuperan en totalidad en la fracción no adsorbida del gel.

10 Tabla 13: rendimiento de afinidad FcXL multicolumna (fase del eluato ajustado a pH 4,8)

Ensayo	Ig G (g.l-1)	Volumen (l)	Ig G (g)	Rendimiento etapa (%) / g IgG por litro de plasma
Plasma 1	4,4	60,7	264,0	92,1 / 7,5
Plasma 2	3,2	70,4	225,3	97,9 / 7,9

- 15 En conclusión, la purificación de las IgG directamente a partir del plasma por cromatografía multicolumna es se puede considerar totalmente a escala industrial, especialmente para tratar unos volúmenes de varios miles de litros de plasma por día.

Tabla 14: Comparación de la capacidad de captura de las IgG con el gel de afinidad FeXI en cromatografía clásica y cromatografía multicolumna (tampones de cromatografía equivalentes).

Tipo de cromatografía	Capacidad en g IgG por litro de gel
Clásica	15
multicolumnas	21

- 20 Tal realización, incluso a escala industrial, permite capturar de manera extremadamente eficaz las inmunoglobulinas presentes en el plasma. Permite también obtener, en una sola etapa, un eluato de gran pureza que conserva las cualidades esperadas de un pool de inmunoglobulinas terapéuticas. Especialmente, se observa una conservación de las cuatro sub-clases de IgG del plasma y una buena eliminación de las IgA, IgM e IgE. A fin de eliminar las trazas residuales de IgA, IgM e IgE, se puede considerar después una cromatografía de intercambio de iones de tipo TMAE (Merck).

Ejemplo 3: Captura de albúmina por cromatografía multicolumna intercambiadora de iones, interacciones hidrófobas o una combinación de ligandos químicos (multimodal)

30 Material y método

Se utilizó un plasma agotado de IgG, recuperado al final del procedimiento de purificación de las IgG según el ejemplo 2, no quedando la albúmina del todo fijada al gel de afinidad utilizado.

- 35 Las características de la fracción plasmática son:

Albúmina humana 16,15 g/l, pH=6.5, conductividad de 12 mS/cm, en tampón citrato 0,01 M.

- 40 La composición de las soluciones utilizadas durante diferentes etapas del procedimiento de cromatografía se resume en la tabla 15 siguiente.

Tabla 15: soluciones tampón para la cromatografía multicolumna en modo mixto.

Fase	Tampón/producto
Pre-equilibrado	Citrato 0,1M, NaCl 0,1M, ajustado pH=6,5
Equilibrado	Citrato 0,01M, NaCl 0,1M, ajustado pH=6,5
Elución	Citrato 0,01M y NaCl 0,1M, pH=3,9

45 Geles de cromatografía en modo mixto

Para la cromatografía de la albúmina, se utiliza un gel sal en modo mixto de tipo HEA Hypercel.

50 Columnas

Se utilizaron 5 columnas radiales en serie de 10 ml cada una en combinación con un autómatas BioSe Lab (Novasep). Se realizan seis ciclos de 164 minutos, es decir 17 horas aproximadamente de funcionamiento de forma continua.

55

Las condiciones de cromatografía multicolumna aplicadas en este ejemplo han permitido confirmar una captura casi completa de la albúmina, quedando muy poca albúmina en la fracción no adsorbida. La tabla siguiente resume los rendimientos en cada fracción recogida y la pureza mínima alcanzada en la fracción de interés purificada.

5 Tabla 16: Rendimiento en albúmina y estimación de la pureza por electroforesis SDS-PAGE

Rendimiento de fracción no adsorbida	Rendimiento eluato	Rendimiento regeneración	Pureza en el eluato
3,4%	87,7%	8,9%	80%

10 Se observa una ganancia de capacidad de al menos el 70% durante el ensayo de cromatografía multicolumna con comparación con un ensayo clásico en el que la carga se detiene cuando se alcanza el 10% de fuga a la salida de la columna. La tabla 17 resume la ganancia calculada para las 2 condiciones.

Tabla 17: Comparación de la capacidad de captura del gel HEA en cromatografía clásica y cromatografía multicolumna (tampones de cromatografía equivalentes)

Tipo de cromatografía	Capacidad en g albúmina por litro de gel
Clásica	30
Multicolumna	52

15 Los resultados de la tabla 17 muestran que solamente el 3,4% aproximadamente de la albúmina no se ha adsorbido. Se observa una pureza electroforética del 80% aproximadamente.

20 Después de la elución a pH=3,9, se ha obtenido un rendimiento del 88%. Este ensayo muestra que al menos el 96% de la albúmina del plasma sanguíneo se ha capturado por cromatografía según un modo cromatográfico multicolumna sobre el soporte HEA-HyperCel y al menos el 88% de esta albúmina se ha recuperado en la elución, lo que corresponde a un resultado captura/elución de al menos el 80%. La cromatografía multicolumna sobre este gel ha permitido hacer pasar la capacidad del gel de 30 g/l en cromatografía clásica a 52 g/l, es decir una reducción del volumen de gel total necesaria por lote del 70%.

25 Como el plasma humano está compuesto de aproximadamente 40 g/l de albúmina, se pueden purificar al menos 33 g/l según este ejemplo.

30 Ejemplo 4: Captura de fibrinógeno por cromatografía multicolumna de afinidad

Material y método

Fracción plasmática

35 Se utiliza un plasma agotado de IgG y en albúmina, recuperado al final del procedimiento de purificación de la albúmina (paso durante 14 horas sobre las dos cromatografías multicolumna) según el ejemplo 3, después de haberse congelado y almacenado a -80°C y después descongelado el día de la captura del fibrinógeno por cromatografía.

40 Características de la fracción plasmática: fibrinógeno antigénico: 0,32 g/l.

Solución tampón

45 La composición de las soluciones tampón utilizadas durante diferentes etapas del procedimiento de cromatografía se resume en la tabla 18 siguiente.

Tabla 18: soluciones tampón para la cromatografía de afinidad.

Fases	Composición	Valores diana
Equilibrado de la columna y retorno a la línea de base	Citrato tri-sódico 10 mM,	pH ajustado a 7,4
	Cloruro de sodio 100 mM	
Pre-elución	Cloruro de sodio 2,0 M	pH ajustado a 7,0
Elución	Trometamol (Tris HCl) 20 mM,	
	Cloruro de magnesio 1,5 M,	pH ajustado a 7,0
	Propilenglicol 20 % v/v,	
	Arginina 200 mM	

50 Geles de cromatografía de afinidad

Para la cromatografía, se utiliza un gel de afinidad CaptureSelect Fibrinogen (Life Technologies ref. 191291050, lote 171013-01) cuyas características de captura del fibrinógeno se resumen en la tabla 19 siguiente.

Tabla 19: Capacidad del gel CaptureSelect Fibrinogen

Carga de fibrinógeno	10 g/l de gel
-----------------------------	---------------

Columnas

Se ha utilizado una columna axial de 5 ml (referencia Tricorn 5/100 (GE Healthcare), volumen de la columna: 1,6 ml; altura de la columna: 8 cm).

Purificación por afinidad

El plasma empobrecido en inmunoglobulinas y albúmina descongelado se inyecta sin modificación sobre la columna de afinidad CaptureSelect Fibrinogen equilibrada. Se ha aplicado una carga de aproximadamente 10 g/l. El contenido de fibrinógeno del eluato se ha analizado mediante el método ELISA.

Resultados

Al final del procedimiento, el rendimiento de fibrinógeno es del 70%. El producto obtenido tiene una concentración de fibrinógeno antigénico de 1,3 mg/ml.

Este ensayo demuestra claramente que es posible capturar las tres proteínas abundantes del plasma utilizando sólo sucesivamente unas etapas de cromatografía (aparte de etapas de inactivación virales y de filtración).

En este ejemplo, se realizaron dos cromatografías multicolumna de forma continua y una cromatografía clásica, una a continuación de la otra, retirando sucesivamente las fracciones no adsorbidas. Esta encadenación de cromatografías (figura 2) durante más de 10 horas no es perjudicial para la calidad de las moléculas capturadas y muy particularmente la molécula que se ha purificado en último lugar, en el presente caso el fibrinógeno. Éste ha conservado muy mayoritariamente su integridad a lo largo del procedimiento de purificación, como lo muestra el SDS-PAGE en condiciones no reductoras y coloración azul de Coomassie de las diferentes cromatografías sucesivas de captura de las inmunoglobulinas, seguida de la captura de la albúmina y finalmente seguida de la captura del fibrinógeno (figura 3).

En esta figura 3, el plasma de partida, y después los eluatos y las fracciones no retenidas, muestran el empobrecimiento sucesivo del plasma respecto a las moléculas capturadas y el enriquecimiento de los eluatos en las molécula capturadas.

El pocillo 1 corresponde al marcador de peso molecular y el pocillo 2 corresponde al plasma normal no purificado.

Los pocillos 3 y 4 corresponden a las fracciones obtenidas en el ejemplo 2.

Los pocillos 5 y 6 corresponden a las fracciones obtenidas en el ejemplo 3.

Los pocillos 7 y 8 corresponden a las fracciones obtenidas en el ejemplo 4.

El fibrinógeno de un peso molecular de 340 kDa conserva mayoritariamente su integridad molecular en el no retenido de la cromatografía multicolumna de captura de las inmunoglobulinas y después en el no retenido de la cromatografía multicolumna de captura de la albúmina. Se observa en el no retenido de la cromatografía de afinidad de captura del fibrinógeno, la ausencia de fibrinógeno, que queda totalmente capturado y se encuentra con una estructura mayoritariamente íntegra en el eluato de esta cromatografía.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de concentrados de proteínas plasmáticas purificadas de uso terapéutico a partir de plasma sanguíneo que comprende unas etapas de purificación según las cuales se somete sucesivamente un plasma sanguíneo o una fracción plasmática de tres cromatografías multicolumna, a fin de recuperar sucesivamente tres concentrados de proteínas plasmáticas purificadas, siendo dichos concentrados de proteínas plasmáticas purificadas de uso terapéutico un concentrado de inmunoglobulinas, un concentrado de fibrinógeno y un concentrado de albúmina.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que al menos una cromatografía multicolumna es una cromatografía multicolumna de afinidad.
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se somete directamente un plasma o un sobrenadante crioprecipitado a una primera etapa de purificación de las inmunoglobulinas humanas que consiste en una cromatografía multicolumna de afinidad.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 o 3, en el que la cromatografía multicolumna de afinidad utiliza un ligando de afinidad seleccionado entre los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpo, los derivados de anticuerpo, los ligandos químicos tales como unos péptidos, unos péptidos miméticos, unos peptoides, unas nanofitinas, y los ligandos oligonucleotídicos tales como los aptámeros, seleccionándose el ligando de afinidad opcionalmente entre los ligandos de afinidad resistentes a las condiciones de saneamiento y/o de reutilización intensiva compatibles con una utilización industrial.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos una cromatografía multicolumna es una cromatografía multicolumna intercambiadora de iones, tal como una cromatografía multicolumna de intercambio de aniones o de cationes, o una cromatografía multicolumna hidrófoba, o una cromatografía multicolumna en modo mixto o una cromatografía multicolumna de exclusión por tamaño.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la cromatografía multicolumna de intercambio de aniones se realiza sobre un gel de polisacárido reticulado o de polímero vinílico o acrílico, injertado de grupos DEAE o TMAE o QAE.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la cromatografía multicolumna de intercambio de aniones y/o en modo mixto se realiza sobre una matriz de alta tolerancia a la sal para capturar la proteína plasmática en un medio que tiene una salinidad elevada, tal como el plasma o la fracción no retenida de una cromatografía.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la primera cromatografía multicolumna es una cromatografía multicolumna intercambiadora de iones según la cual se somete directamente el plasma o el sobrenadante de plasma crioprecipitado a una cromatografía multicolumna de intercambio de aniones, y opcionalmente en el que se somete la fracción que contiene dichas inmunoglobulinas humanas a una etapa posterior de purificación por precipitación con ácido caprílico y se recupera el sobrenadante que contiene las inmunoglobulinas.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la primera cromatografía multicolumna es una cromatografía multicolumna de afinidad según la cual se somete directamente el plasma o el sobrenadante de plasma crioprecipitado a una etapa de purificación de la albúmina y/o del fibrinógeno, y opcionalmente en el que se somete la fracción que contiene la albúmina y/o el fibrinógeno a una etapa posterior de purificación por precipitación con ácido caprílico y se recupera la fracción que contiene la albúmina y/o el fibrinógeno.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la fracción retenida de al menos una cromatografía multicolumna de afinidad o intercambiadora de iones es la proteína plasmática de interés, siendo dicha proteína plasmática de interés después eluida.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la fracción retenida de al menos una cromatografía multicolumna de afinidad o intercambiadora de iones contiene los contaminantes, comprendiendo la fracción no retenida la proteína de interés.
12. Procedimiento de fraccionamiento de plasma sanguíneo que comprende las etapas que consisten en someter directamente un plasma sanguíneo o un sobrenadante de plasma crioprecipitado o una fracción plasmática a:
 - una cromatografía multicolumna de afinidad en la que al menos un ligando de afinidad es un ligando que une específicamente las inmunoglobulinas, al final de la cual se recupera la fracción que contiene las inmunoglobulinas; y
 - una cromatografía multicolumna intercambiadora de iones y/o en modo mixto, opcionalmente altamente tolerante a la sal, al final de la cual se recupera la fracción que contiene la albúmina y/o el fibrinógeno; y

- una etapa de purificación de dicha fracción no retenida de la cromatografía multicolumna precedente que contiene el fibrinógeno y/o la albúmina por precipitación y/o por cromatografía.

5 13. Procedimiento de fraccionamiento de plasma sanguíneo que comprende las etapas que consisten en someter directamente el plasma sanguíneo o el sobrenadante de plasma crioprecipitado o una fracción plasmática a:

10 - una cromatografía multicolumna de afinidad en la que al menos un ligando de afinidad es un ligando que une específicamente las inmunoglobulinas, al final de la cual se recupera la fracción que contiene las inmunoglobulinas; y

- una cromatografía multicolumna de afinidad en la que al menos un ligando de afinidad es un ligando que une específicamente el fibrinógeno, al final de la cual se recupera la fracción que contiene el fibrinógeno; y

15 - una cromatografía multicolumna de afinidad en la que al menos un ligando de afinidad es un ligando que une específicamente la albúmina, al final de la cual se recupera la fracción que contiene la albúmina.

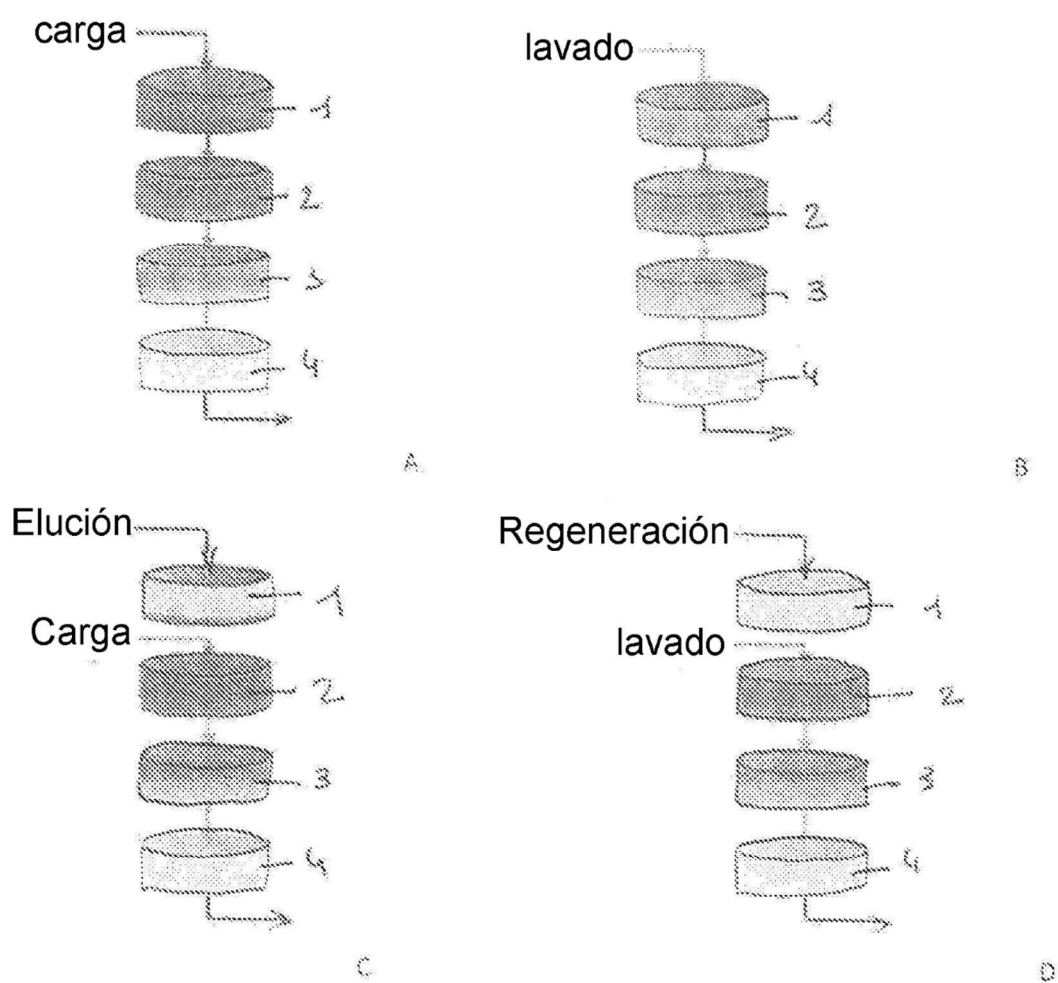


Figura 1

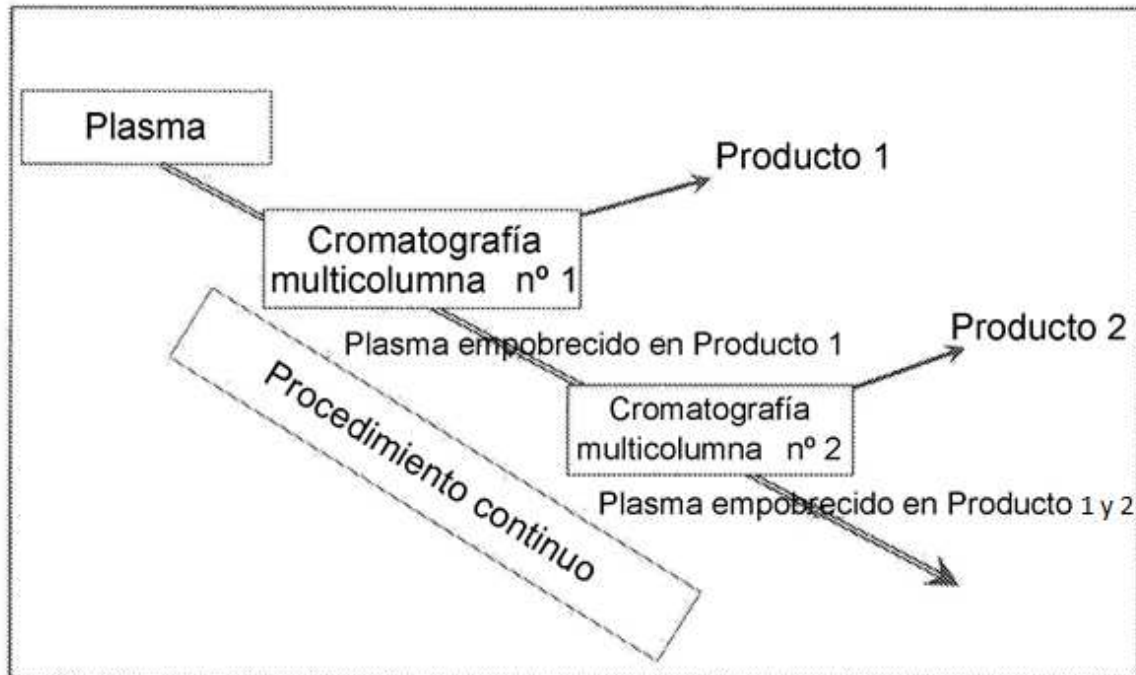


Figura 2

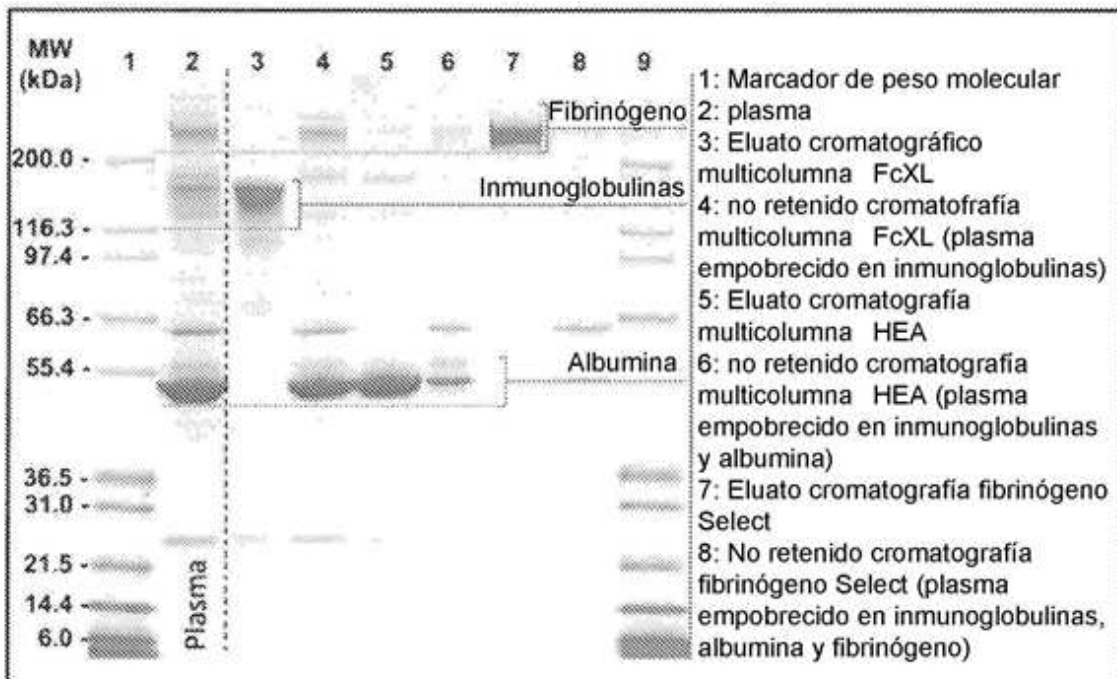


Figura 3