



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 524 516**

(21) Número de solicitud: 201430824

(51) Int. Cl.:

A61K 38/38 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN

B1

(22) Fecha de presentación:

29.05.2014

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

09.12.2014

Fecha de la concesión:

24.03.2015

(45) Fecha de publicación de la concesión:

31.03.2015

(73) Titular/es:

**GRIFOLS WORLDWIDE OPERATIONS LIMITED
(100.0%)
Embassy House, Ballsbridge
Dublin 4 IE**

(72) Inventor/es:

**JORQUERA NIETO , Juan Ignacio;
ORTIZ FERNÁNDEZ , Ana María y
COSTA RIEROLA , Montserrat**

(74) Agente/Representante:

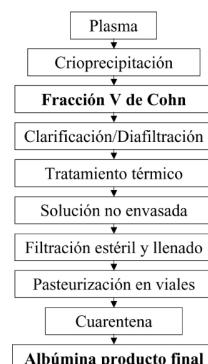
DURÁN MOYA, Luis Alfonso

(54) Título: **Procedimiento de preparación de albúmina humana con nivel de oxígeno disuelto reducido**

(57) Resumen:

Procedimiento de preparación de albúmina humana con nivel de oxígeno disuelto reducido. La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de una solución de albúmina humana, más en particular, se refiere a un procedimiento que comprende una etapa de reducción del oxígeno disuelto en dicha solución de albúmina hasta una concentración igual o menor que 0,5 ppm. Con el procedimiento de la presente invención es posible obtener una solución de albúmina humana con un estado redox más cercano al estado redox de la albúmina presente en el plasma humano.

FIGURA 1



DESCRIPCIÓN

Procedimiento de preparación de albúmina humana con nivel de oxígeno disuelto reducido

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de una solución de albúmina humana, más en particular, se refiere a un procedimiento que comprende una etapa de reducción del oxígeno disuelto en dicha solución de albúmina hasta una concentración igual o menor que 0,5 ppm. Con el procedimiento de la presente invención es posible obtener una solución de albúmina humana con un estado redox más cercano al
10 estado redox de la albúmina presente en el plasma humano.

La albúmina humana es una proteína no glicosilada de 66 kDa. Cuantitativamente, es la proteína más importante del plasma y su concentración en el plasma normal se encuentra entre 35 y 50 g/L, constituyendo hasta el 60% del total de proteínas plasmáticas (Peters T.

- 15 J.: All About Albumin; Biochemistry, Genetics and Medical Applications. Academic Press, San Diego, 1996).

- La estructura de la albúmina humana consiste en un polipéptido de 585 aminoácidos y aproximadamente un 67% de hélices alfa sin estar presentes hojas beta (Otagiri M., Chuang
20 V.T. Pharmaceutically important pre- and posttranslational modifications of human serum albumin. *Biol Pharm Bull* 2009; 32:527-534). La albúmina humana contiene 6 residuos de metionina y 35 de cisteína, implicados en la formación de 17 enlaces disulfuro. La Cys-34 es la única cisteína libre en toda la molécula. La albúmina humana presenta funciones
25 antioxidantes específicas debido a su capacidad de unión a múltiples ligandos y propiedades de atrapamiento de radicales, ambas estrechamente relacionadas con su estructura.

- Aunque existen muchas posibilidades de oxidación de la albúmina, Cys-34 es un sitio particularmente sensible a la oxidación/reducción. Por lo tanto, en general, es legítimo hablar del estado redox de la albúmina en términos de Cys-34. Mediante la separación
30 cromatográfica de la albúmina, se obtienen tres fracciones según el estado redox de Cys-34 (Peters, 1996 anterior):

- (i) la forma reducida con la cisteína en forma de grupo tiol libre, denominada mercaptoalbúmina humana (HMA);

- 5 (ii) la forma oxidada con la cisteína formando un enlace disulfuro con un compuesto de tiol pequeño, principalmente cisteína o cisteinilglicina, aunque también con homocisteína y glutatión, denominada no mercaptoalbúmina humana 1 (HNA1); y (iii) la forma más oxidada con la cisteína como ácido sulfínico o sulfónico, denominada no mercaptoalbúmina humana 2 (HNA2).

En una persona sana saludable, aproximadamente el 50-69% de la albúmina total se encuentra en forma de HMA, el 27-42% en forma de HNA1 y el 3-5% en forma de HNA2 (Oettl K., y otros. *Oxidative damage of albúmina in advanced liver disease*. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782: 469-473; Oettl K. y Marsche G. *Redox State of Human Serum Albumin in Terms of Cysteine-34 in Health and Disease*. *Methods Enzymol.* 2010; 474:181-95; y Oettl K. y otros. *Oxidative albúmina damage in chronic liver failure: relation to albúmina binding capacity; liver dysfunction and survival*. *J Hepatol*, 2013, 59:978-983). Por lo general, se cree que la oxidación de HMA a HNA1 es reversible, mientras que la oxidación a HNA2 resulta en 15 un proceso irreversible.

20 La albúmina puede sufrir diversas modificaciones estructurales tanto *in vivo* como durante los procedimientos empleados para producir la albúmina terapéutica, lo que hace que se modifique su conformación y, por tanto, sus propiedades de unión, así como su estado redox (Oettl, K. y otros, 2010 citado anteriormente).

25 El método habitualmente utilizado en el fraccionamiento del plasma humano para la obtención de proteínas purificadas, entre las que se encuentra la albúmina, es el llamado método de Cohn (Cohn E.J.y otros. "Preparation and properties of serum plasma proteins, IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.* (1946) 68, 459-475) o modificaciones menores del mismo.

30 El método de Cohn parte de plasma humano, que se somete a sucesivas etapas de precipitación y separación. En cada una de ellas se obtiene un precipitado enriquecido en alguna de las proteínas plasmáticas y un sobrenadante de decantación. Para conseguir la precipitación de las sucesivas fracciones de Cohn (Fracción I, Fracción II+III, Fracción IV y Fracción V) es necesario modificar parámetros de la solución con el fin de variar la solubilidad de las distintas proteínas tales como pH, constante dieléctrica, temperatura, 35 concentración proteica y fuerza iónica, entre otros. Cabe señalar, además, que dichas fracciones de Cohn contienen concentraciones crecientes de etanol. Así pues, la albúmina

5 contenida en el sobrenadante de la Fracción IV es precipitada con etanol aproximadamente al 40% (v/v) y pasa a formar parte de la pasta de la Fracción V.

10 Una vez obtenida la Fracción V, ésta es resuspendida en una solución y se somete a

15 diferentes etapas hasta obtener el producto final. Habitualmente, estas etapas incluyen: diafiltración, tratamiento térmico, filtración estéril, llenado en viales y pasteurización final de los viales, antes de someter a cuarentena dichos viales, por lo general, durante un período no menor de 14 días a 30-32°C, con el fin de asegurar la esterilidad del producto final.

20 Los presentes inventores han descubierto que durante el proceso de obtención de una solución de albúmina a partir de plasma humano, la albúmina sufre modificaciones en el estado redox de Cys-34. Estas modificaciones se producen fundamentalmente durante el almacenamiento en presencia de oxígeno, por lo que se detectan fundamentalmente después de la etapa de cuarentena. Se ha encontrado en varios lotes de producción (n=7) que los niveles de HMA, HNA1 y HNA2 son de 40-53%, 39-44% y 7-16% (p/v), respectivamente, y, por lo tanto, principalmente los niveles de HMA y HNA2 difieren de los descritos en personas sanas saludables (Oettl K. 2008, 2010 y 2013, citados anteriormente). Esto podría tener significativa importancia, por ejemplo, en el caso de HNA2, ya que la oxidación a HNA2 resulta en un proceso irreversible, tal como se mencionó anteriormente.

25

30 Sorprendentemente, los inventores han descubierto que mediante la adición de una etapa en el proceso de producción de una solución de albúmina humana, que comprende la reducción del oxígeno disuelto en la solución en la que se reduce el nivel de oxígeno hasta una concentración igual o menor que 0,5 ppm, se logra reducir la oxidación de Cys-34, obteniéndose un estado redox de la albúmina que es muy similar al estado redox que presenta la albúmina en el plasma sanguíneo. Esto hace que las propiedades de la albúmina obtenida, por ejemplo, sus propiedades antioxidantes sean más parecidas a las de la albúmina presente en la sangre y que pueda dar lugar a una mejora de su eficacia terapéutica en muchas de sus aplicaciones.

35

30 Por lo tanto, la presente invención da a conocer un procedimiento de preparación de una solución de albúmina humana caracterizado porque comprende una etapa de reducción del oxígeno disuelto en dicha solución de albúmina en la que el nivel de oxígeno se reduce hasta una concentración igual o menor que 0,5 ppm. Preferentemente después de la etapa de reducción del oxígeno disuelto en la solución de albúmina, dicha solución de albúmina se mantiene en una atmósfera de gas inerte.

Dicha etapa de reducción del oxígeno disuelto en la solución de albúmina se puede llevar a cabo de varias maneras conocidas en la técnica. Preferentemente, se puede realizar un tratamiento superficial de la solución de albúmina con un gas inerte o burbujeando un gas inerte en el interior de dicha solución de albúmina. Dicho gas inerte utilizado en el procedimiento de la presente invención puede ser nitrógeno, helio o similares.

5 El procedimiento de la presente invención se puede utilizar para la obtención de soluciones de albúmina que presenten una concentración de albúmina entre 4 y 25% (p/v) 10 aproximadamente. Preferentemente, la albúmina obtenida es albúmina terapéutica.

Además, la albúmina de la presente invención puede ser albúmina obtenida de forma recombinante o de forma transgénica. La molécula de albúmina recombinante o transgénica es idéntica a la humana en cuanto a su secuencia de aminoácidos, no presenta glicosilación 15 y, para que sea funcional, tiene que presentar el mismo plegamiento conformacional que la albúmina de origen plasmástico humano. Si no fuese así, no podría ser administrada a humanos por el riesgo de inmunogenicidad, entre otros posibles efectos adversos causados por dichas diferencias.

20 La etapa de reducción del oxígeno disuelto en la solución de albúmina de la presente invención se puede llevar a cabo antes o después de una etapa de pasteurización de dicha solución de albúmina, o incluso se puede llevar a cabo aunque no se realice una etapa de pasteurización de dicha solución de albúmina, siendo independiente del proceso de preparación de la solución inicial de albúmina.

25

Para obtener mejores resultados en cuanto al estado redox de Cys-34 en la solución de albúmina obtenida mediante el procedimiento de la presente invención, preferentemente después de la etapa de reducción del oxígeno disuelto en la solución de albúmina, dicha solución de albúmina se mantiene en una atmósfera de gas inerte. Dicha atmósfera de gas 30 inerte puede ser de nitrógeno, helio o similares.

Aunque es posible utilizar cualquier envase en los que se envasa y/o almacena la albúmina obtenida mediante el procedimiento de la presente invención, es preferente que dicho envase esté fabricado de un material impermeable al oxígeno, más preferentemente de 35 vidrio.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer una composición que comprende albúmina humana preparada mediante el procedimiento de la presente invención y su uso como medicamento.

- 5 Por último, la presente invención da a conocer el uso de una composición que comprende albúmina preparada según el procedimiento descrito anteriormente para la preparación de un medicamento.

10 A continuación, la presente invención se describe más en detalle en relación con ejemplos y ejemplos comparativos, que no constituyen una limitación de la invención. Además, se hace referencia a las figuras, en las que:

- La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de un procedimiento de obtención de albúmina humana terapéutica a partir de plasma utilizado en la técnica anterior.

15 - La Figura 2 muestra una gráfica de la concentración de las formas HMA, HNA1 y HNA2 de Cys-34 de la albúmina expresada como la altura del pico obtenido mediante cromatografía en varias etapas del procedimiento utilizado en la técnica anterior a la presente invención: (□) Plasma de donantes sanos (n=59); (★) sobrenadante de crioprecipitación (n=3); (⊗) solución de albúmina antes de añadir estabilizantes y antes del tratamiento térmico (n=3); (●) solución de albúmina con estabilizantes y antes del tratamiento térmico (n=1); (■) solución de albúmina con estabilizantes y después del tratamiento térmico (n=1); (◆) solución de albúmina 20% antes de la filtración estéril (n=3); (▲) solución de albúmina 20% estéril y en envase final (n=4); (▼) solución de albúmina 20% pasteurizada en envase final y sin cuarentena (n=4); y (○) albúmina producto final 20% (n=7); en la que n representa el número de lotes analizados.

20 - La Figura 3 muestra una gráfica de la concentración de las formas HMA, HNA1 y HNA2 de Cys-34 de la albúmina expresada como la altura del pico obtenido mediante cromatografía en varias etapas, utilizando el procedimiento de la técnica anterior a la presente invención: (▲) solución de albúmina 25% estéril y en envase final (n=1); (▼) solución de albúmina 25% pasteurizada sin cuarentena (n=1); y (●) albúmina 25% producto final (n=1); (▲) solución de albúmina 5% estéril y en envase final (n=1); (▼) solución de albúmina 5% pasteurizada en envase final y sin cuarentena (n=1); y (●) albúmina 5% producto final (n=1); en la que n representa el número de lotes analizados.

- La Figura 4 muestra una gráfica de la concentración de las formas HMA, HNA1 y HNA2 de Cys-34 de la albúmina expresada como la altura del pico obtenido mediante cromatografía en varias etapas, utilizando el procedimiento de la presente invención en el que se utilizó una etapa de tratamiento superficial con nitrógeno gaseoso antes de la 5 pasteurización: (▲) solución de albúmina 20% estéril y en envase final (n=3); (▼) solución de albúmina 20% pasteurizada en envase final y sin cuarentena (n=3); y (○) albúmina 20% producto final (n=3); en la que n representa el número de lotes analizados.
- La Figura 5 muestra una gráfica de la concentración de las formas HMA, HNA1 y HNA2 10 de Cys-34 de la albúmina expresada como la altura del pico obtenido mediante cromatografía en varias etapas, utilizando el procedimiento de la presente invención en el que se utilizó una etapa de tratamiento de burbujeo de nitrógeno gaseoso en la solución de albúmina antes de la pasteurización: (▲) solución de albúmina 20% estéril y en envase final (n=3); (▼) solución de albúmina 20% pasteurizada en envase final y sin cuarentena (n=3); y 15 (○) albúmina 20% producto final (n=3); en la que n representa el número de lotes analizados.
- La Figura 6 muestra una gráfica de la concentración de las formas HMA, HNA1 y HNA2 20 de Cys-34 de la albúmina expresada como la altura del pico obtenido mediante cromatografía en varias etapas, utilizando el procedimiento de la presente invención en el que se utilizó una etapa de tratamiento superficial con nitrógeno gaseoso antes de la pasteurización: (▲) solución de albúmina 25% estéril no envasada (n=1); (▼) solución de 25 albúmina 25% pasteurizada sin cuarentena (n=1); y (●) albúmina 25% producto final (n=1); (▲) solución de albúmina 5% estéril y en envase final (n=1); (▼) solución de albúmina 5% pasteurizada en envase final y sin cuarentena (n=1); y (●) albúmina 5% producto final (n=1); en la que n representa el número de lotes analizados.
- La Figura 7 muestra una gráfica de la concentración de las formas HMA, HNA1 y HNA2 30 de Cys-34 de la albúmina expresada como la altura del pico obtenido mediante cromatografía en varias etapas, utilizando el procedimiento de la presente invención en el que se utilizó una etapa de tratamiento superficial con helio gaseoso en la solución de albúmina antes de la pasteurización: (▲) solución de albúmina 25% estéril y en envase final (n=1); (▼) solución de albúmina 25% pasteurizada en envase final y sin cuarentena (n=1); y (●) albúmina 25% producto final; en la que n representa el número de lotes analizados.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Procedimiento de obtención de albúmina según la técnica anterior

Plasma humano obtenido de donantes sanos, se sometió a sucesivas etapas de 5 precipitación y separación, según el método de Cohn (Cohn E.J. y otros, 1946, citado anteriormente), desde la obtención del sobrenadante de crioprecipitación inicial, hasta conseguir la precipitación de la Fracción V (ver Figura 1). La Fracción V de Cohn se suspendió en agua fría para inyección (API), se ajustó a pH 7,0 y se clarificó mediante filtros de profundidad. La solución clarificada se diafiltró a volumen constante, aplicando una 10 solución de diálisis formada por una sal de iones monovalentes (cloruro sódico) y manteniendo la temperatura a 5 °C (Figura 1, etapa de clarificación/diafiltración). A continuación se añadió caprilato sódico y N-acetiltriptófano como estabilizantes a la solución diafiltrada. Dicha solución se sometió a un tratamiento térmico a 60 °C (Figura 1, etapa de 15 tratamiento térmico). Posteriormente la solución tratada térmicamente se diluyó con API o se concentró en función de la concentración proteica final deseada (por ejemplo, 5%, 20% o 25% (p/v)) (Figura 1, solución no envasada). A continuación, la solución final se filtró de forma estéril (filtros de 0,22 µm) y se procedió al llenado de los envases finales estériles en zona aséptica (Figura 1, etapa de filtración estéril y llenado). La solución en el envase final se calentó a 60 °C durante no menos de 10 h (Figura 1, etapa de pasteurización en viales). 20 Por último, los viales se incubaron a 30 -32 °C durante no menos de 14 días (Figura 1, etapa de cuarentena). Tras dicho periodo, los viales fueron inspeccionados visualmente para descartar cualquier indicio de contaminación microbiana (Figura 1, albúmina producto final).

El estado oxidativo de las muestras de albúmina procedentes de distintas etapas del 25 proceso de obtención de la albúmina (Figura 2), fue analizado mediante cromatografía de alta resolución (HPLC), en base a la metodología descrita por Oettl K., 2010, citado anteriormente, y según se detalla a continuación.

Las muestras de albúmina en estudio fueron diluidas en tampón de cloruro sódico 0,3 M, 30 fosfato sódico 0,1 M, pH 6,87, hasta una concentración de 6,5 mg/ml y se inyectaron 5 µl en una columna de intercambio aniónico Shodex-Asahipak ES-502N DEAE (7,5 x 100 mm, Shodex, Japón), a un flujo de 1,0 ml/min. La separación de las muestras de albúmina en tres fracciones (HMA, HNA1 y HNA2), según su estado oxidativo, se consiguió tras realizar la elución de las mismas utilizando un gradiente de acetato sódico 50 mM y sulfato sódico 400 35 mM, a pH 4,85, hasta alcanzar un 6% de etanol a un flujo constante de 1,0 ml/min a 35°C.

Los 5 primeros minutos de elución se realizaron en ausencia de etanol. En los siguientes 5 a 35 minutos, la concentración de etanol se incrementó de forma lineal hasta el 6%, manteniéndose posteriormente constante durante otros 5 minutos. Finalmente, del minuto 40 al 45, la concentración de etanol se redujo de nuevo hasta el 0%. Transcurridos 5

5 minutos más sin etanol, la siguiente muestra pudo ser analizada.

La detección de las tres fracciones de la albúmina en función de su estado oxidativo, se realizó mediante fluorescencia utilizando como longitudes de onda de excitación y emisión 280 y 340 nm respectivamente. La cuantificación de la concentración de las formas HMA, 10 HNA1 y HNA2 de Cys-34 de la albúmina se realizó teniendo en cuenta la altura de cada uno de los picos de interés obtenidos en el correspondiente cromatograma.

La Figura 2, muestra la evolución del estado oxidativo de las muestras de albúmina sérica humana procedentes de distintas etapas a lo largo del proceso de obtención de albúmina de 15 la técnica anterior. Los datos muestran aumento de las formas HNA1 y HNA2 en detrimento de la forma HMA, sobretodo tras la etapa de pasteurización con posterior cuarentena (albúmina 20% producto final). El comportamiento del estado oxidativo de la albúmina tras las etapas de pasteurización y cuarentena en albúminas al 5% y 25 % de concentración purificadas de plasma humano con el procedimiento de la técnica anterior (Figura 3) es 20 equivalente al observado para las albúminas 20% producto final siguiendo la misma técnica (Figura 2). En ambas figuras, los datos obtenidos muestran aumento de las formas HNA1 y HNA2 en detrimento de la forma HMA, sobretodo tras la etapa de pasteurización con posterior cuarentena

25 Ejemplo 2: Procedimiento de obtención de albúmina de la presente invención utilizando una etapa de tratamiento superficial con nitrógeno antes de la pasteurización

El procedimiento de obtención de la albúmina de la presente invención se corresponde con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, incluyendo además una etapa de reducción de 30 oxígeno disuelto en la solución de albúmina, tal como se describe a continuación.

Tras la obtención de la solución estéril en el envase final (Figura 1, etapa de filtración estéril y llenado), y a modo de desplazar el oxígeno presente en el interior del envase, se realizó un tratamiento superficial con nitrógeno insertando en el tapón de clorobutilo del vial dos agujas 35 hipodérmicas (del tipo comercial Braun Sterican 21Gx1 ½", 0,80x40 mm, Alemania, o similar) conectadas a dos filtros de PVDF de 0,22 µm (del tipo comercial Millipore filtro

Millex-GV, 0,22 µm, PVDF, 13 mm, EEUU, o similar) y evitando el contacto de las agujas con la solución de albúmina. Una de las agujas fue destinada a la entrada del gas nitrógeno y la otra a su salida a modo de evitar la sobrepresión dentro del envase. El tratamiento con nitrógeno superficial se llevó a cabo a temperatura ambiente, durante dos horas, 5 manteniendo un flujo constante de nitrógeno que permitiera apreciar el movimiento del líquido dentro del envase sin que éste llegara a salpicar dentro del mismo.

Finalizado el tratamiento superficial con nitrógeno, el procedimiento de obtención de albúmina a partir de plasma humano continuó tal y como se describe en el Ejemplo 1 (Figura 10 1, etapa de pasteurización en viales), hasta la obtención de albúmina producto final. Del mismo modo que en el Ejemplo 1, se analizó el estado oxidativo mediante cromatografía de intercambio aniónico de las muestras de albúmina al 20% de concentración obtenidas con la técnica de la presente invención. En concreto se analizaron muestras de albúmina sometidas a una etapa de tratamiento superficial con nitrógeno antes de la pasteurización, 15 muestras de albúmina después de la pasteurización y antes de cuarentena, y muestras de albúmina tras el periodo de cuarentena. La Figura 4 muestra los resultados obtenidos, apreciándose la no disminución de la forma HMA y el no aumento de las formas HNA1 y HNA2 observados en las Figuras 2 y 3 con el procedimiento de obtención de la albúmina de la técnica anterior.

20 Adicionalmente al análisis del estado oxidativo, se realizó la medición del oxígeno disuelto presente en las muestras tras el tratamiento superficial con nitrógeno, obteniéndose que en todos los casos la concentración de oxígeno disuelto fue igual o menor que 0,5 ppm.

25 La determinación se realizó a temperatura ambiente, mediante el uso de una sonda para la medición de oxígeno disuelto (del tipo comercial HI 9828 Medidor Multi-paramétrico, Hanna Instruments, EEUU). En concreto, el envase con la solución de albúmina previamente sometida al tratamiento superficial con nitrógeno se abrió en el interior de una cabina con atmósfera de nitrógeno, e inmediatamente se sumergió la sonda para la medición de 30 oxígeno en la muestra. La sonda empleada, cuyo funcionamiento se basa en el principio de la célula galvánica, consta de un ánodo de plata (Ag) revestido con un alambre de platino (Pt), que funciona como cátodo. El conjunto anteriormente descrito se encuentra insertado en una cubierta protectora llena de una solución electrolítica de cloruro potásico que en su extremo tiene una membrana de Teflon®, un material permeable al gas que permite el paso 35 del oxígeno presente en la solución, pero no el paso de la solución en sí. Mediante la aplicación de un potencial de 790 mV, el oxígeno presente en la célula se reduce a iones

hidróxido (OH^-) en el cátodo, y se deposita cloruro de plata en el ánodo. Esta reacción provoca un flujo de corriente con intensidad proporcional a la cantidad de oxígeno presente en la muestra. El medidor convierte entonces la medición del flujo de corriente en la concentración correspondiente de oxígeno disuelto.

5

Ejemplo 3: Procedimiento de obtención de albúmina de la presente invención utilizando una etapa de burbujeo de nitrógeno en la solución antes de la pasteurización

El procedimiento de obtención de la albúmina de la presente invención se corresponde con 10 el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, incluyendo la etapa que se describe a continuación. Tras la obtención de la solución estéril en el envase final (Figura 1, etapa de filtración estéril y llenado), y a modo de desplazar el oxígeno presente en interior del envase se realizó el tratamiento de burbujeo de nitrógeno insertando en el tapón de clorobutilo del 15 vial dos agujas hipodérmicas (del tipo comercial Braun Sterican 21Gx1 ½", 0,80x40 mm, Alemania, o similar) conectadas a dos filtros de PVDF de 0,22 μm (del tipo comercial Millipore filtro Millex-GV, 0,22 μm , PVDF, 13 mm, EEUU, o similar). La aguja destinada a la 20 entrada del gas nitrógeno, una aguja espinal (del tipo comercial Terumo Spinal Needle, 18Gx3 ½", 1,20x90mm, Japón, o similar), fue sumergida en la solución de albúmina, y la aguja hipodérmica (del tipo comercial Braun Sterican 21Gx1 ½", 0,80x40 mm, Alemania, o similar), colocada evitando el contacto con el líquido, fue destinada a su salida a modo de evitar la sobrepresión dentro del envase. El tratamiento de burbujeo con nitrógeno se llevó a cabo a temperatura ambiente, durante dos horas, manteniendo un flujo constante de nitrógeno que permitiera observar la aparición de pequeñas burbujas dentro líquido.

25 Finalizado el tratamiento de burbujeo de nitrógeno, el procedimiento de obtención de albúmina a partir de plasma humano continuó tal y como se describe en el Ejemplo 1 (Figura 1, etapa de pasteurización en viales), hasta la obtención de la albúmina producto final.

30 Del mismo modo que en los Ejemplos 1 y 2, se analizó el estado oxidativo mediante cromatografía de intercambio aniónico de las muestras de albúmina al 20% de concentración obtenidas con la técnica de la presente invención. En concreto se analizaron muestras de albúmina sometidas a una etapa de burbujeo de nitrógeno antes de la etapa de pasteurización, muestras de albúmina después de la pasteurización y antes de cuarentena y 35 muestras de albúmina tras el periodo de cuarentena. La Figura 5 muestra los resultados obtenidos, siendo estos similares a los obtenidos en la Figura 4, utilizando una etapa de tratamiento superficial con nitrógeno antes de la pasteurización. Se aprecia la no

disminución de la forma HMA y el no aumento de las formas HNA1 y HNA2 observados en la Figura 2 y 3, con el procedimiento de obtención de albúmina de la técnica anterior.

En este caso se realizó también la medición del oxígeno disuelto presente en las muestras 5 tras el tratamiento con burbujeo de nitrógeno, del mismo modo que en el Ejemplo 2, obteniéndose, que en todos los casos la concentración de oxígeno disuelto fue igual o menor que 0,5 ppm.

Ejemplo 4: Procedimiento de obtención de albúmina de la presente invención utilizando una 10 etapa de tratamiento superficial con nitrógeno antes de la pasteurización, aplicado a diferentes concentraciones finales de albúmina

El procedimiento de obtención de la albúmina de la presente invención se corresponde con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2, aplicado a otras concentraciones de albúmina 15 tales como 5 y 25%. Del mismo modo que en el Ejemplo 2, se analizó el estado oxidativo mediante cromatografía de intercambio aniónico de las muestras de albúmina al 5 y 25% de concentración obtenidas con la técnica de la presente invención. En concreto se analizaron muestras de albúmina 5 y 25% sometidas a una etapa de tratamiento superficial con nitrógeno antes de la pasteurización, muestras de albúmina 5 y 25% después de la 20 pasteurización y antes de cuarentena, y muestras de albúmina 5 y 25% tras el periodo de cuarentena. La Figura 6 muestra los resultados obtenidos, siendo estos similares a los obtenidos en la Figura 4 para albúminas a una concentración del 20%. Se aprecia la no disminución de la forma HMA y el no aumento de las formas HNA1 y HNA2 observados en las Figuras 2 y 3 con el procedimiento de obtención de la albúmina de la técnica anterior.

25

Adicionalmente al análisis del estado oxidativo, se realizó la medición del oxígeno disuelto presente en las muestras tras el tratamiento superficial con nitrógeno, obteniéndose que en todos los casos la concentración de oxígeno disuelto fue igual o menor que 0,5 ppm.

30 Ejemplo 5: Procedimiento de obtención de albúmina de la presente invención utilizando una etapa de tratamiento superficial con helio antes de la pasteurización

El procedimiento de obtención de la albúmina de la presente invención se corresponde con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, incluyendo la etapa descrita a continuación. Tras 35 la obtención de la solución estéril en el envase final (Figura 1, etapa de filtración estéril y llenado), y a modo de desplazar el oxígeno presente en la cámara de aire remanente en el

vial, se realizó el tratamiento superficial con helio insertando en el tapón de clorobutilo, y evitando el contacto con la solución de albúmina, dos agujas hipodérmicas (del tipo comercial Braun Sterican 21Gx1 ½", 0,80x40 mm, Alemania, o similar) conectadas a dos filtros de PVDF de 0,22 µm (del tipo comercial Millipore filtro Millex-GV, 0,22 µm, PVDF, 13 mm, EEUU, o similar) y evitando el contacto de las agujas con la solución de albúmina. Una de las agujas fue destinada a la entrada del gas helio y la otra a su salida a modo de evitar la sobrepresión dentro del envase. El tratamiento con helio superficial se llevó a cabo a temperatura ambiente, durante dos horas, manteniendo un flujo constante de helio que permitiera apreciar el movimiento del líquido dentro del envase sin que éste llegara a salpicar dentro del mismo.

Finalizado el tratamiento superficial con helio, el procedimiento de obtención de albúmina a partir de plasma humano continuó tal y como se describe en el Ejemplo 1 (Figura 1, etapa de pasteurización en viales), hasta la obtención de albúmina producto final.

Del mismo modo que en los Ejemplos 1 a 4 se analizó el estado oxidativo mediante cromatografía de intercambio aniónico de las muestras de albúmina obtenidas con la técnica de la presente invención. En concreto se analizaron muestras de albúmina sometidas a una etapa de tratamiento superficial con helio antes de la pasteurización, muestras de albúmina después de la pasteurización y antes de cuarentena, y muestras de albúmina tras el periodo de cuarentena. La Figura 7 muestra los resultados obtenidos, siendo estos similares a los obtenidos en las Figuras 4 y 6, utilizando una etapa de tratamiento superficial con nitrógeno antes de la pasteurización, y también a los obtenidos en la Figura 5, utilizando una etapa de burbujeo de nitrógeno en la solución antes de la pasteurización. Se aprecia la no disminución de la forma HMA y el no aumento de las formas HNA1 y HNA2 observados en las Figuras 2 y 3, con el procedimiento de obtención de albúmina de la técnica anterior.

En este caso se realizó también la medición del oxígeno disuelto presente en las muestras tras el tratamiento con burbujeo de helio, del mismo modo que en el Ejemplo 2, obteniéndose, que en todos los casos la concentración de oxígeno disuelto fue igual o menor que 0.5 ppm.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de una solución de albúmina humana caracterizado porque comprende una etapa de reducción del oxígeno disuelto en dicha solución de albúmina en la 5 que el nivel de oxígeno se reduce hasta una concentración igual o menor que 0,5 ppm.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de reducción del oxígeno disuelto en la solución de albúmina se lleva a cabo realizando un tratamiento superficial de la solución de albúmina con un gas inerte. 10
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de reducción del oxígeno disuelto en la solución de albúmina se lleva a cabo burbujeando un gas inerte en el interior de dicha solución de albúmina. 15
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la albúmina es de origen plasmático, recombinante o transgénico
5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la solución de albúmina presenta una concentración de albúmina entre 4 y 25% (p/v). 20
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizado porque el gas inerte utilizado es nitrógeno o helio.
7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la 25 etapa de reducción del oxígeno disuelto en la solución de albúmina se realiza antes de una etapa de pasteurización de dicha solución de albúmina.
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la etapa de reducción del oxígeno disuelto en la solución de albúmina se realiza después de 30 una etapa de pasteurización de dicha solución de albúmina.
9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque después de la etapa de reducción del oxígeno disuelto en la solución de albúmina, dicha solución de albúmina se mantiene en una atmósfera de gas inerte. 35

10. Procedimiento, según la reivindicación 9, caracterizado porque la atmósfera de gas inerte es de gas de nitrógeno o helio.
11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque la
5 solución de albúmina se envasa y/o almacena en un recipiente fabricado de un material impermeable al oxígeno.
12. Procedimiento, según la reivindicación 11, caracterizado porque el material impermeable al oxígeno es vidrio.
- 10
13. Composición que comprende albúmina humana preparada mediante un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizada porque presenta una concentración de oxígeno disuelto igual o menor que 0,5 ppm.
- 15
14. Uso de una composición que comprende albúmina, según la reivindicación 13, para la preparación de un medicamento.

FIGURA 1



FIGURA 2

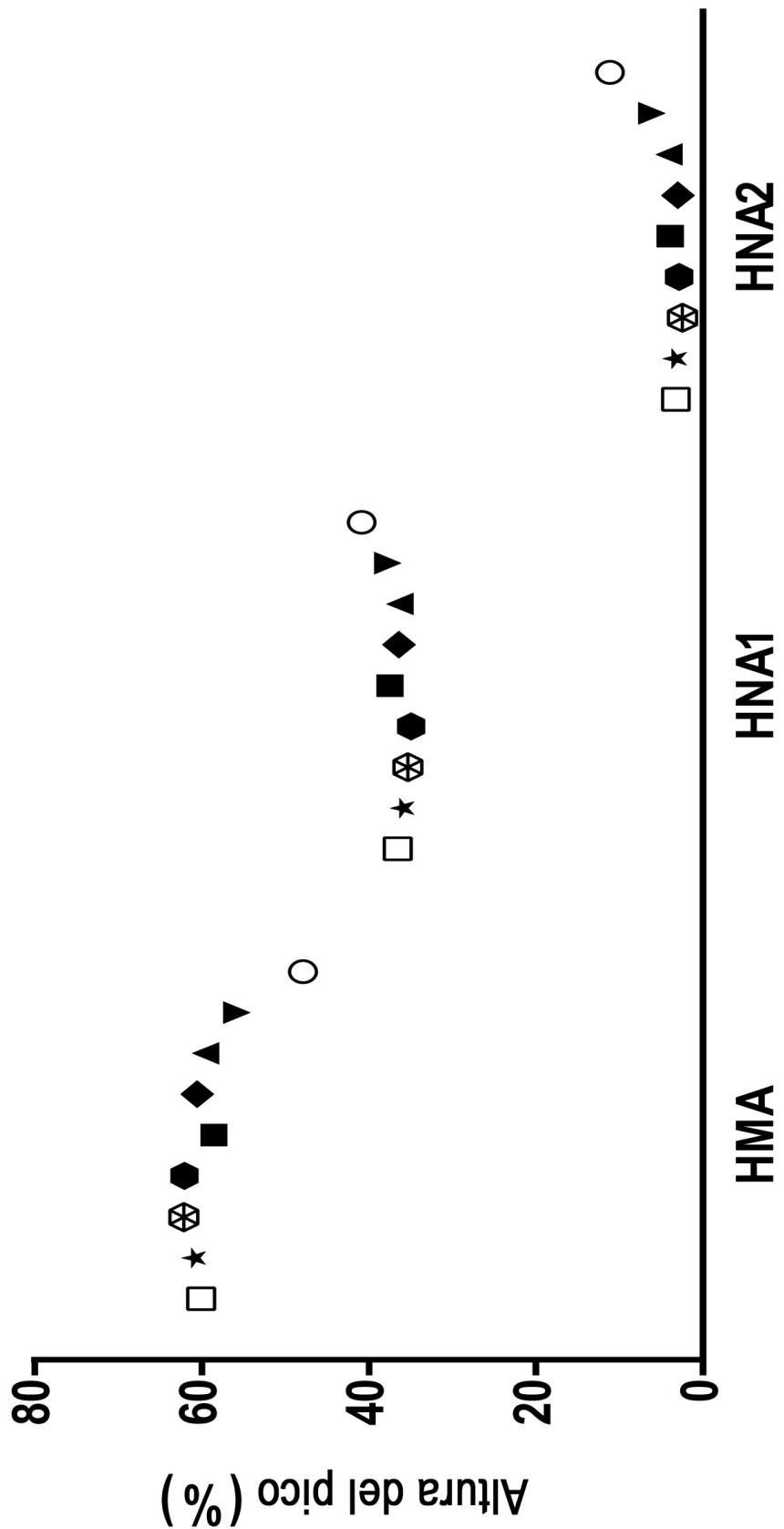


FIGURA 3

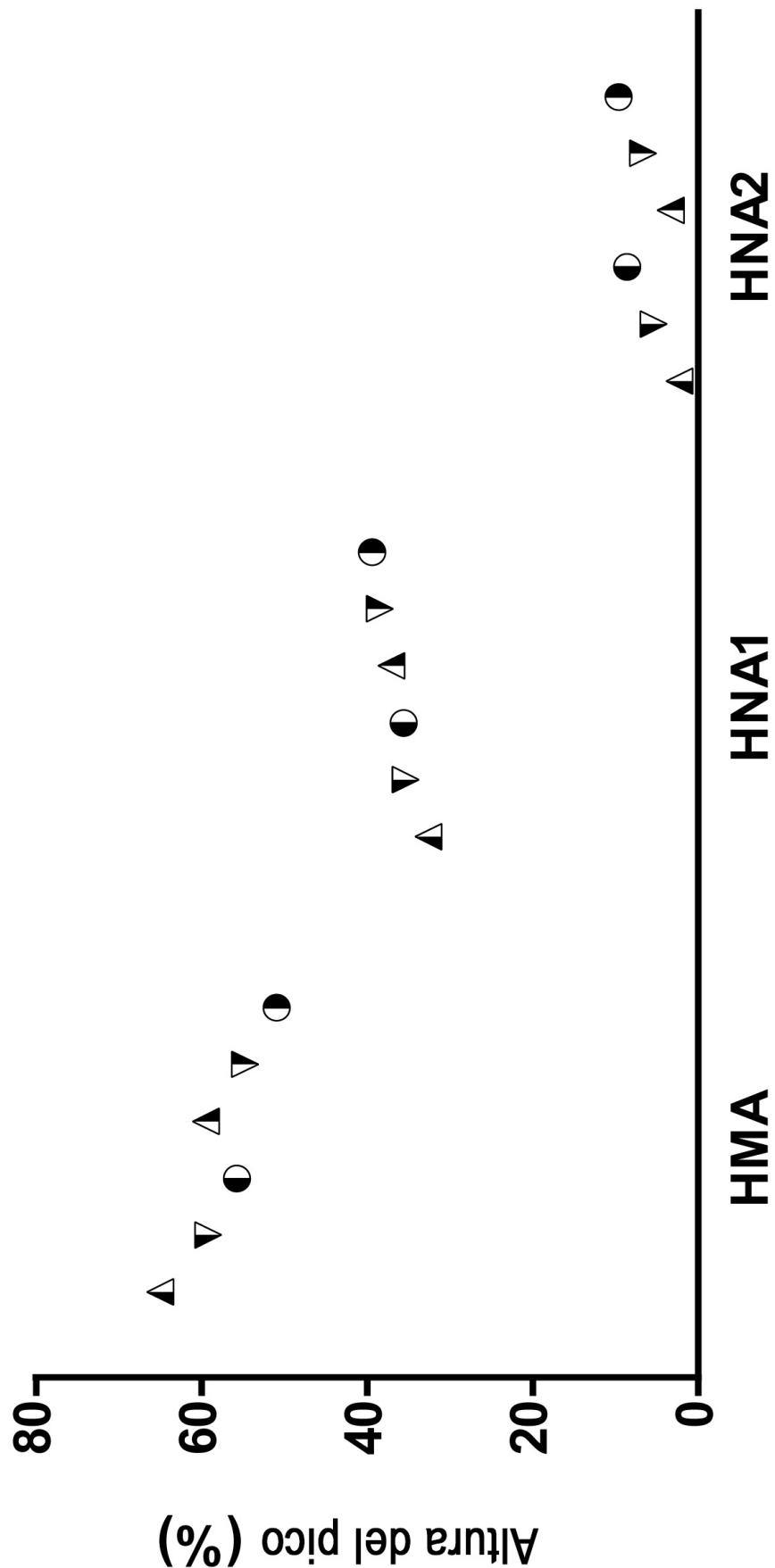


FIGURA 4

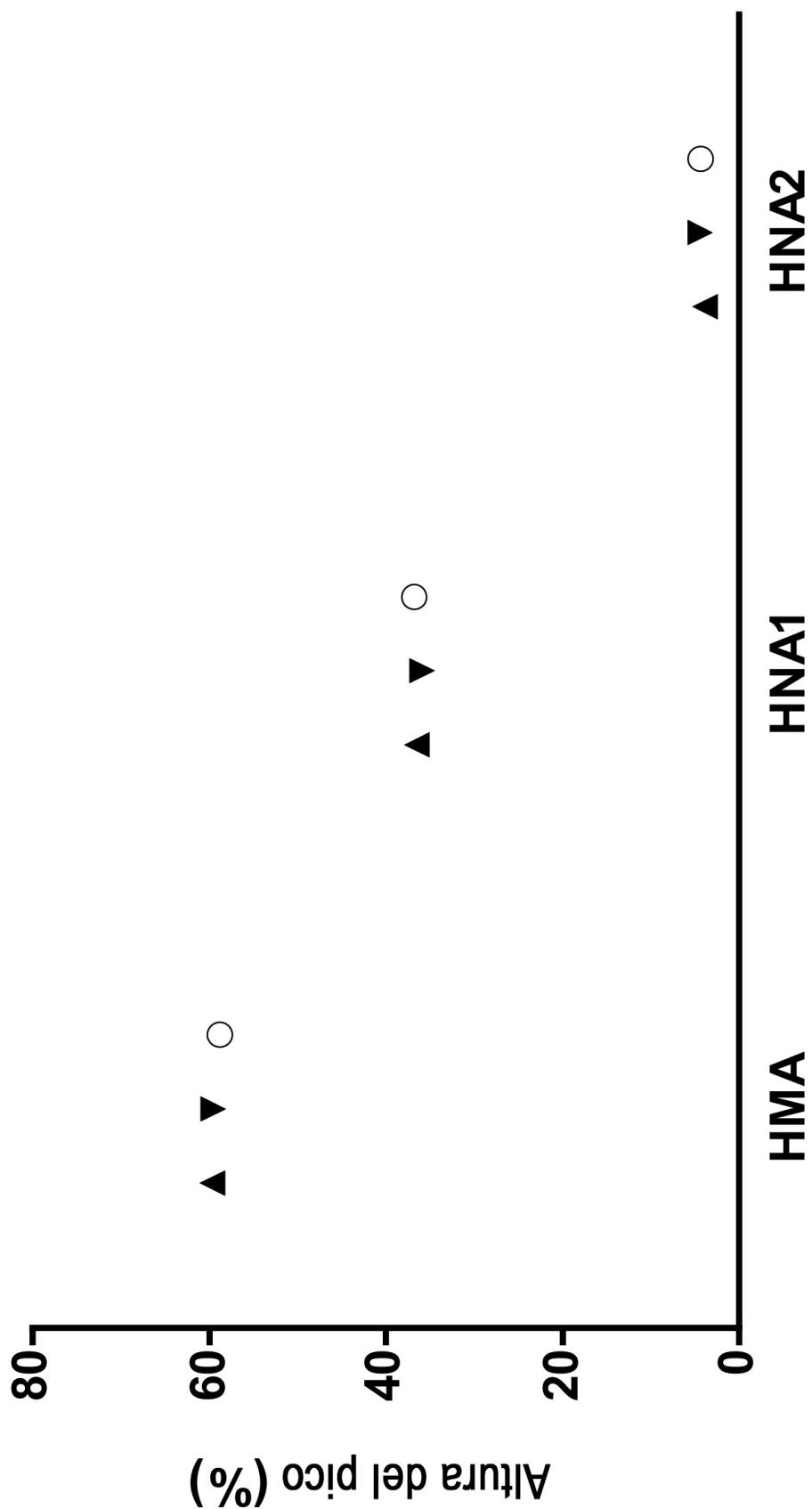


FIGURA 5

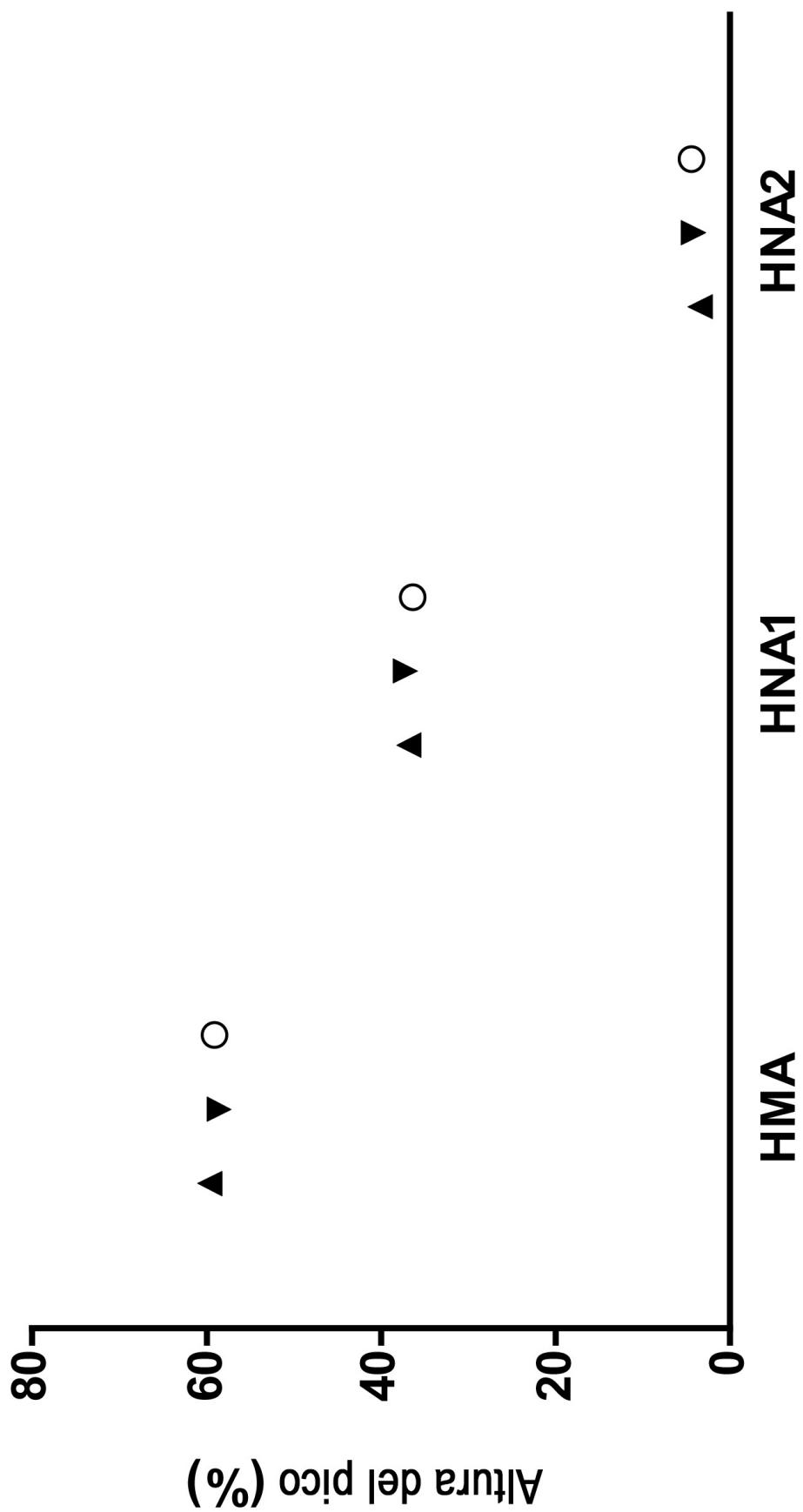


FIGURA 6

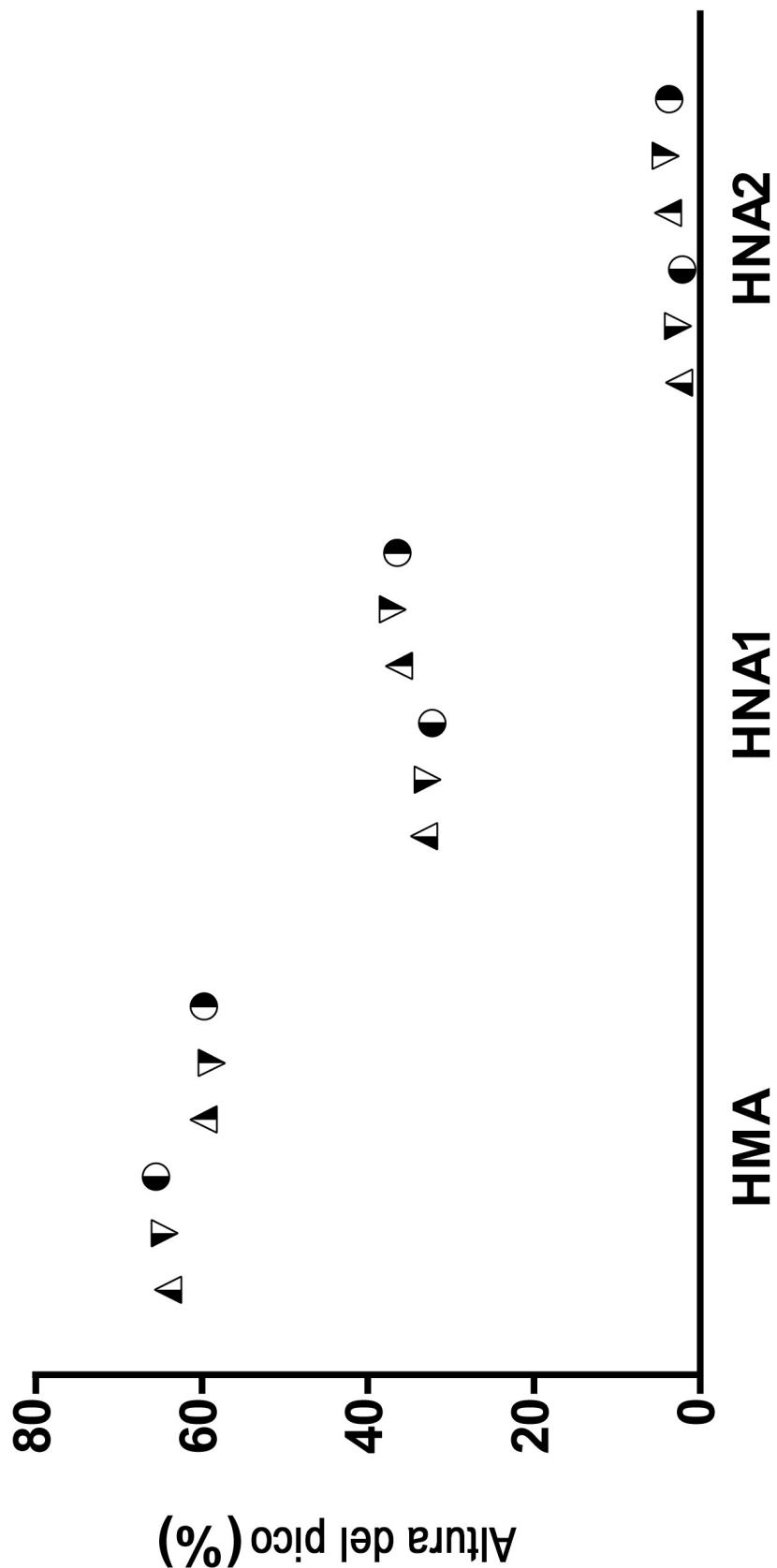
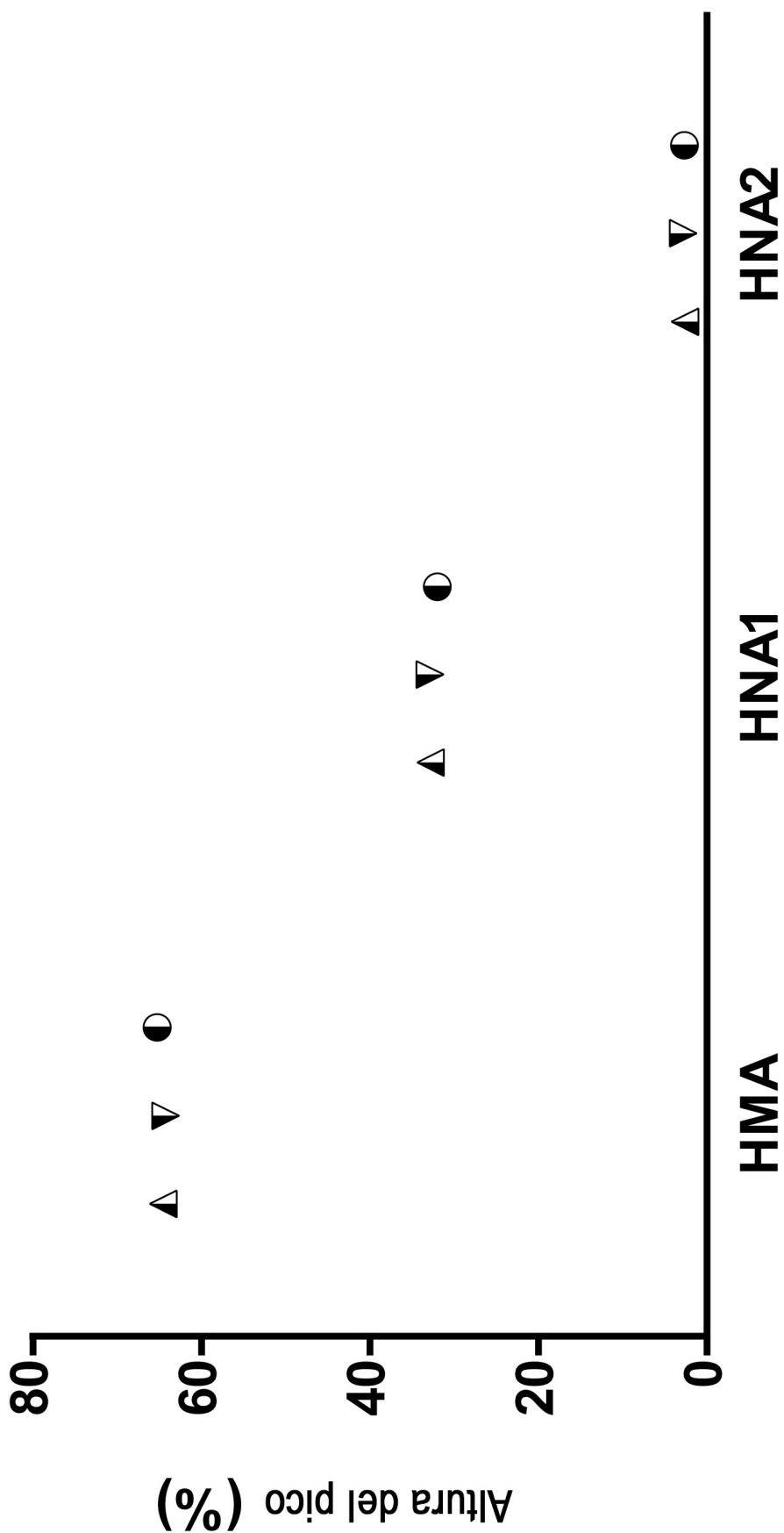


FIGURA 7





②1 N.º solicitud: 201430824

②2 Fecha de presentación de la solicitud: 29.05.2014

③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: **A61K38/38 (2006.01)**

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	AKERS, M. J. & DEFELIPPIS, M. R. Peptides and proteins as parenteral solutions. En: Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins. EEUU, Editado por Hovgaard, L., Frokjaer, S., van de Weert, M. Taylor & Francis Group. Segunda edición. 2012. ISBN 978-1-4398-5388-7. Capítulo 8, en especial páginas161-162.	1-14
X	WO 2003020325 A2 (CLEARANT INC et al.) 13.03.2003, página 1, líneas 1-10; página 8; página 22; ejemplo 4.	1-14
A	HAYASHI, T. et al. The importance of sample preservation temperature for analysis of the redox state of human serum albumin. Clinica Chimica Acta. Febrero 2002, Vol. 316, Nº 1-2, páginas: 175-178. ISSN 0009-8981 (impreso) <Doi:10.1016/S0009-8981(01)00721-5>	1,13,14
A	MARIE, A.-L. et al. Capillary zone electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry for analyzing qualitative and quantitative variations in therapeutic albumin. Analytica Chimica Acta. Octubre 2013, Vol. 800, páginas 103-110. ISSN 1873-4324 (electrónico) <Doi:10.1016/j.aca.2013.09.023>	1,13,14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 18.11.2014	Examinador E. Relaño Reyes	Página 1/5
--	-------------------------------	---------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, INSPEC, COMPDX, XPESP, XPESP2

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.11.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14 Reivindicaciones	SI NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones Reivindicaciones 1-14	SI NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	AKERS, M. J. & DEFELIPPIS, M. R. Peptides and proteins as parenteral solutions. En Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins. Segunda edición. 2012.	2012
D02	WO 2003020325	13.03.2003
D03	HAYASHI, T. et al. Clinica Chimica Acta. Febrero 2002, Vol. 316, Nº 1-2, páginas: 175-178.	02.2002
D04	MARIE, A.-L. et al. Analytica Chimica Acta. Octubre 2013, Vol. 800, páginas 103-110.	24.10.2013

D01 afirma que es frecuente el tratamiento de las soluciones farmacéuticas proteicas con gases inertes, entre ellos el nitrógeno y el helio, con el fin de disminuir la concentración de oxígeno.

En D02 se divulga un método para esterilizar preparaciones de albúmina, mediante irradiación. En una de las alternativas, se prepara la albúmina en una atmósfera inerte, antes de la irradiación.

D03 estudia la estabilidad de la albúmina, comprobando que su almacenaje a -20° C o a temperatura ambiente, produce una oxidación paulatina de la misma. Además, observa que en los preparados comerciales, el porcentaje de albúmina reducida (HSA) es menor que en la albúmina en estado fisiológico, lo que afecta a su actividad biológica.

En D04 se analiza en distintas composiciones comerciales el porcentaje de albúmina reducida, encontrándose una gran variabilidad. Es importante determinar la cantidad de albúmina en forma HSA, ya que ésta es la más activa biológicamente.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la solicitud, es un procedimiento para la preparación de una solución de albúmina humana, caracterizado por que comprende una etapa de reducción del oxígeno disuelto en dicha solución a una concentración menor o igual a 0,5 ppm, mediante su tratamiento superficial o su burbujeo con nitrógeno o helio (reivindicaciones de la 1 a la 12). También se incluye una composición de albúmina cuya concentración de oxígeno sea menor o igual a 0,5 ppm (reivindicación 13) y el uso de dicha composición en la fabricación de un medicamento (reivindicación 14).

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)

Las reivindicaciones de la 1 a la 14 cumplen el requisito de novedad (art. 6.1 LP 11/1986).

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

2.2.REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 12

Las reivindicaciones 1 y 4 tienen por objeto, un procedimiento para la preparación de una solución de albúmina humana, que comprende una etapa de reducción del oxígeno disuelto a una concentración menor o igual a 0,5 ppm. Esta disminución se lleva a cabo mediante un tratamiento superficial con un gas inerte (reivindicación 2) o burbujeando dicho gas (reivindicación 3), siendo este gas helio o nitrógeno (reivindicación 6). Dicha etapa se puede realizar antes o después de la pasteurización (reivindicaciones 7 y 8 respectivamente). Tras la reducción del oxígeno disuelto, la solución se mantiene en una atmósfera de gas inerte (reivindicación 9) con helio o nitrógeno (reivindicación 10) y se envasa en un recipiente fabricado en un material impermeable al oxígeno (reivindicación 11) como el vidrio (reivindicación 12). Por último, la concentración de la solución de albúmina es del 4-25% (p/v) (reivindicación 5).

En D01 se anticipa el uso de gases inertes, en concreto el nitrógeno y el helio, con el fin de desplazar el oxígeno de las soluciones proteicas. Esta etapa se puede realizar tanto mediante un tratamiento superficial, como mediante burbujeo (reivindicaciones 2, 3, 6), antes del filtrado, o justo antes del envasado (reivindicaciones 7 y 8). Por último, las soluciones se mantienen en atmósfera inerte y se envasan en recipientes de vidrio (reivindicaciones de la 9 a la 12).

Aunque no se menciona la albúmina humana ni su concentración, dado que es conocida la importancia del estado oxidativo de la albúmina para su correcta actividad biológica, y que de la solicitud no se deriva que se haya tenido que solventar una dificultad técnica relevante en la aplicación de la etapa divulgada en D01, se considera obvia su aplicación a una solución de albúmina del 4 al 25% (p/v) (reivindicaciones 1, 4, y 5). Además, el límite de 0,5 ppm se considera una mera optimización de la técnica para conseguir el efecto deseado (reivindicación 1).

D02 divulga un procedimiento de esterilización de albúmina de cualquier origen biológico (reivindicación 4), en la que ésta se mantiene en atmósfera inerte, por ejemplo en el helio o el argón (reivindicación 6) antes de ser irradiada. En el ejemplo 4, se burbujea con argón una solución de albúmina al 25% (reivindicaciones 3 y 5) antes de su irradiación.

Aunque en D02 no se especifica la concentración de oxígeno (reivindicación 1), dado que el objetivo es la eliminación del oxígeno disuelto, este límite no se considera relevante, sino derivado de la optimización de la técnica. La eliminación del oxígeno mediante el tratamiento superficial (reivindicación 2) en vez de mediante burbujeo, se considera una de las alternativas de uso común en el estado de la técnica para llevar a cabo dicho objetivo, no produciendo un efecto técnico sorprendente. Dado que de la solicitud se deduce que la eliminación del oxígeno se puede realizar antes o después de la etapa de pasteurización, el momento en el que ésta se produzca no se considera relevante (reivindicaciones 7 y 8). Por último, al conocerse la importancia del estado oxidativo de la albúmina y su tendencia a la oxidación, se considera obvio el mantenimiento de la misma en helio o nitrógeno y su envasado en vidrio (reivindicaciones de la 9 a la 12).

Por lo tanto, en vista de cualquiera de los documentos D01 o D02, se entiende que las reivindicaciones de la 1 a la 12, no presentan actividad inventiva (art. 8.1 LP 11/1986).

2. 2. REIVINDICACIONES 13 Y 14

El objeto de la reivindicación 13 es una composición de albúmina con una concentración de oxígeno disuelto menor o igual a 0,5 ppm, y el de la reivindicación 14, su uso en la fabricación de un medicamento.

D01 anticipa la preparación de composiciones farmacéuticas proteicas sin oxígeno. Aunque no indica el límite de la concentración de oxígeno disuelto, ni especifica que se puedan preparar soluciones de albúmina, por los mismos motivos expuestos en el apartado 2.1, se considera obvia la preparación de la misma.

Por otro lado, D02 divulga una composición que se ha burbujeado con argón con el fin de desplazar el oxígeno disuelto. Aunque no indican la cantidad de oxígeno incluido, se entiende que este límite no es relevante ya que el objetivo es la eliminación total del oxígeno disuelto. Además, se describe la utilidad de la albúmina en la preparación de medicamentos (reivindicación 14).

En consecuencia, a la luz de cualquiera de los documentos D01 y D02, las reivindicaciones 13 y 14 no tienen actividad inventiva (art. 8.1 LP 11/1986).