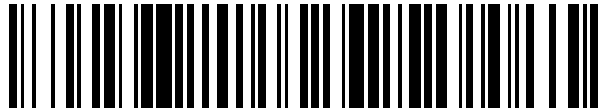


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 940 304**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 14/775</b>	(2006.01)
<b>C07K 1/14</b>	(2006.01)
<b>C07K 1/30</b>	(2006.01)
<b>C07K 1/34</b>	(2006.01)
<b>C07K 1/36</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/685</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/688</b>	(2006.01)
<b>A61P 3/06</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2014 PCT/AU2014/000584**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14194362**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2014 E 14808213 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2022 EP 3004160**

54 Título: **Proceso para preparar apolipoproteína A-I (Apo A-I)**

30 Prioridad:

**05.06.2013 US 201361831304 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.05.2023**

73 Titular/es:

**CSL LIMITED (100.0%)  
45 Poplar Road  
Parkville VIC 3052, AU**

72 Inventor/es:

**VUCICA, YVONNE y  
WARREN, GARY LEE**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 940 304 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

Proceso para preparar apolipoproteína A-I (Apo A-I)

5 Campo

La presente invención se refiere a un proceso de recuperación de apolipoproteína A-I (Apo A-I) de una fracción de proteínas que contiene Apo A-I.

10 Antecedentes

La apolipoproteína A-I humana es el principal componente proteico de (HDL), que es una lipoproteína importante en la sangre. Es sintetizado por el hígado y el intestino y es responsable de la función fisiológica de HDL en la sangre; la eliminación del colesterol de los tejidos periféricos, llevándolo de regreso al hígado o a otras lipoproteínas, mediante un mecanismo conocido como "transporte inverso de colesterol" (RCT).

15 La clara correlación entre niveles elevados de colesterol en suero y el desarrollo de enfermedad coronaria ha sido repetidamente confirmada, en base a estudios epidemiológicos y longitudinales.

20 Por lo tanto, se piensa que la Apo A-I en HDL tiene una función antiinflamatoria y frena la aparición y el desarrollo de CHD. Además, se ha demostrado que la Apo A-I disminuye el nivel de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la sangre y se sabe que se une a las endotoxinas, por lo que tiene un papel importante en la función antiendotoxina de las HDL.

25 El papel "protector" de HDL y Apo A-I como su componente principal ha sido confirmado en una serie de estudios que hacen de la Apo A-I un candidato prometedor (particularmente como parte de una HDL reconstituida) para aplicaciones en el tratamiento de la aterosclerosis, el tratamiento del síndrome coronario agudo (ACS), tratamiento antiinflamatorio, tratamiento con antitoxinas, fármacos dirigidos al hígado, etc.

30 Hoy en día, el plasma sanguíneo humano se recoge en grandes cantidades y se procesa en fracciones individuales, algunas de las cuales contienen apolipoproteína A-I. Las fracciones pueden producirse mediante fraccionamiento con etanol de acuerdo con un procedimiento desarrollado originalmente en los Estados Unidos y conocido como métodos Cohn o Cohn-Oncley [E. J. Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. 68, 459-475, 1946; J. L. Oncley et al., J. Am. Chem. Soc. 71, 541-550, 1949]. Las fracciones de plasma que contienen apolipoproteínas también pueden producirse mediante una variante de este método, el procedimiento de Kistler-Nitschmann [H. Nitschmann et al., Helv. Chim. Acta 37, 866-873, 1954; P. Kistler and H. Nitschmann, Vox Sang 7, 414-424, 1962]. Ambos métodos se basan en la precipitación diferencial en alcohol.

40 Se han descrito varios enfoques en la bibliografía para recuperar la apolipoproteína A-I de las fracciones de precipitación con etanol:

La US 5,089,602 por ejemplo, se refiere a la preparación de apolipoproteínas a partir de fracciones de plasma o suero sanguíneo humano resuspendiendo las fracciones en una solución tampón acuosa en el intervalo de pH de 3 a 5 o de 6 a 9. Los contaminantes indeseables se precipitan mediante la adición de un alcohol alifático de cadena corta. Se usan tampones que contienen altas concentraciones de etanol (68-96% de etanol) para precipitar los contaminantes. La posible agregación de lipoproteínas se inhibe mediante temperatura elevada, pH ligeramente alcalino o mediante la adición de agentes caotrópicos o sustancias tensioactivas, que posteriormente se eliminan mediante filtración en gel. Se incluye un paso de cromatografía de intercambio aniónico para unir los contaminantes, mientras pasan las apolipoproteínas.

50 Kim et al., Manufacturing and Shelf Stability of Reconstituted High-density Lipoprotein for Infusion Therapy, Biotechnology and Bioprocess Engineering 16, 785-792 (2011) divulgan el uso de tampones de extracción que contienen urea en una concentración de 6 M.

55 En la WO 98/07751 se describe una combinación de los dos métodos mencionados anteriormente para recuperar apolipoproteína A (Apo A-I) o apolipoproteína E (ApoE) del plasma humano. Dicho documento divulga un proceso que comprende por lo menos un paso de prepurificación mediante el uso de un tampón de extracción que contiene 8 M de urea y un paso de purificación adicional usando cromatografía de intercambio aniónico. En la WO 98/07751, experimentos que usan un tampón de extracción que comprendía 20% de etanol dieron como resultado un 1% de recuperación de Apo A-I. La WO2009/025754 enseña métodos para separar Apo A-I de alfa-1 antitripsina, que incluye el uso de concentraciones más bajas de etanol (del 8 al 14%) para precipitar Apo A-I.

60 Peitsch et al (1989) analiza un método de purificación para la apolipoproteína A-I y A-II. La KR100992488B1 (2010) analiza un método para la purificación de la apolipoproteína A-I en donde se precipita la ApoP-I. Lerch et al (1996) analiza la producción y caracterización de una lipoproteína de alta densidad reconstituida para aplicaciones terapéuticas. Lerch et al (1989) también analiza el aislamiento y las propiedades de la

apolipoproteína A para uso terapéutico.

También se usan otros métodos, como la centrifuga ultrarrápida y la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), para recuperar la Apo A-I. Sin embargo, la preparación de Apo A-I requiere mucho tiempo y solo pueden prepararse cantidades pequeñas de Apo A-I mediante estos métodos. Por lo tanto, estos métodos no son adecuados para una producción industrial de Apo A-I.

Por tanto, sigue habiendo una necesidad de un método para extraer y recuperar Apo A-I de fracciones de proteínas que contienen Apo A-I, que sea adecuado para la producción a gran escala y que permita adquirir Apo A-I con un alto rendimiento.

### Sumario

En la presente se proporcionan procesos para obtener Apo A-I a partir de una fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A), que comprende a) suspender la fracción de proteínas que contiene Apo A-I en una solución tampón que comprende del 15 al 30% de un alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado (p/p) para formar una suspensión, en donde la fracción de proteínas que contiene Apo A-I suspendida (A) tiene un pH en el intervalo de 6,4 a 10,0, (b) eliminar las impurezas de la suspensión a la vez que se mantienen solubilizadas las proteínas Apo A-I, (c) precipitar Apo A-I de la suspensión, y (d) recoger el precipitado de Apo A-I.

En algunas realizaciones, la solución tampón comprende el 20% del alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado (p/p). En algunas realizaciones, la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) suspendida tiene un pH en el intervalo de 8,1 a 8,5. En algunas realizaciones, la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) suspendida tiene un pH en el intervalo de 7,0 a 7,6. En algunas realizaciones, la solución tampón comprende de 5 mM a 35 mM de NaHCO<sub>3</sub>. En algunas realizaciones, el alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado es etanol.

En algunas realizaciones, la relación de volumen de la fracción de proteínas Apo A-I a la solución tampón en el paso (a) es de 1:1 a 1:5.

En algunas realizaciones, la suspensión formada en el paso (a) tiene una conductividad de menos de 5 mS/cm.

En algunas realizaciones, las impurezas se eliminan en el paso (b) por precipitación añadiendo alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado a una concentración de alcohol del 45 al 65% (p/p).

En algunas realizaciones, el alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado añadido en el paso (b) tiene una temperatura de aproximadamente -5° C a 15° C. En algunas realizaciones, las impurezas precipitadas en el paso (b) se eliminan de la suspensión mediante filtración, centrifugación, decantación, ultrafiltración y/o sedimentación.

En algunas realizaciones, en el paso (c), el pH de la suspensión se ajusta en el intervalo de 4,6 a 5,6. En algunas realizaciones, en el paso (c), la suspensión tiene una temperatura de -2 a 20° C para la precipitación de Apo A-I.

De acuerdo con cualquier realización, el proceso puede comprender además el paso (e), en donde el precipitado de Apo A-I recogido se elimina de los lípidos, por ejemplo mediante la adición de alcohol, por ejemplo etanol, a una concentración dentro del intervalo de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 96% de etanol (p/p). En realizaciones particulares, el precipitado de Apo A-I recogido se elimina de los lípidos mediante la adición de etanol a una concentración de aproximadamente el 40% o aproximadamente el 50%. El etanol puede ser cualquier etanol de calidad farmacéutica. En realizaciones particulares de la invención, el etanol es un etanol de calidad farmacéutica al 95% (3A que contiene un 5% de metanol).

De acuerdo con algunas realizaciones, el proceso proporciona Apo A-I purificada con un rendimiento de por lo menos 0,50 g/l de plasma.

La divulgación proporciona además una Apo A-I purificada que comprende: (a) menos de 0,3 mg de IgA por gramo de Apo A-I.

También se proporciona Apo A-I obtenida mediante cualquier proceso como se describe en la presente, composiciones farmacéuticas que comprenden dicha Apo A-I y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y/o métodos para producir tales composiciones.

También se proporciona HDL reconstituida preparada a partir de Apo A-I obtenida mediante cualquier proceso como se describe en la presente, composiciones farmacéuticas que comprenden dicha HDL reconstituida y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y/o métodos para producir HDL reconstituida y/o composiciones que comprenden la misma.

Breve descripción de los dibujos

- 5 Fig. 1: Influencia del volumen de tampón, la concentración de tampón, la concentración de etanol, la temperatura, el pH y el tiempo de mezclado sobre el rendimiento de Apo A-I. La Fig. 1 muestra que el rendimiento de Apo A-I obtenido a partir de plasma se maximiza cuando se usa una solución tampón (B) que comprende concentraciones más bajas de etanol.
- 10 Fig. 2: Influencia de la concentración de etanol y el pH sobre el rendimiento de Apo A-I. La Fig. 2 muestra que el rendimiento de Apo A-I obtenido a partir de plasma se maximiza cuando se usa una solución tampón (B) que comprende etanol en una concentración dentro del intervalo del 15 y el 30%.
- 15 Fig. 3: Gráfico de contorno que presenta el impacto de la concentración de etanol y el pH sobre el rendimiento de Apo A-I. La Fig. 3 muestra además la influencia del pH sobre el rendimiento de Apo A-I cuando se usa una concentración de etanol dentro del intervalo del 20 al 50%. El rendimiento se maximiza cuando la Apo A-I se suspende en una solución tampón (B) que comprende un etanol a una concentración dentro del intervalo del 15 y el 30% y un pH de la suspensión dentro del intervalo de 6,4 a 10,0.
- 20 Fig. 4: Gráfico de línea ajustada que muestra la influencia de la concentración de etanol sobre el rendimiento de Apo A-I. La Fig. 4 muestra que el rendimiento de Apo A-I obtenido a partir de plasma se maximiza cuando se usa una solución tampón (B) que comprende etanol a una concentración dentro del intervalo del 15 y el 30%.
- 25 Fig. 5: Actividad proteolítica (A) y tiempo de coagulación del tiempo de tromboplastina parcial no activado (NaPTT) (B) en precipitado de Apo A-I (paso d) purificado por el método descrito en el Ejemplo 6. La Fig. 5 muestra que minimizar el tiempo de enfriamiento durante la resolubilización del material de la Fracción IV reduce la actividad proteolítica y la activación del factor de coagulación en las preparaciones de Apo A-I purificadas.
- 30

## Descripción detallada

35 La invención proporciona un proceso para obtener Apo A-I a partir de una fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A), que comprende:

- 40 (a) suspender la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) en una solución tampón (B) que comprende del 15 al 30% de un alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado (p/p), en donde la fracción de proteínas que contiene Apo A-I suspendida (A) tiene un pH en el intervalo de 6,4 a 10,0,
- (b) eliminar las impurezas de la suspensión a la vez que se mantienen solubilizadas las proteínas Apo A-I,
- (c) precipitar Apo A-I de la suspensión, y
- (d) recoger el precipitado de Apo A-I,

45 en donde la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) es una fracción IV de plasma, el alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado es etanol; la solución tampón (B) comprende NaHCO<sub>3</sub> de 5 mM a 35 mM; en donde en el paso (a), la proporción de volumen de la fracción de proteínas Apo A-I (A) a la solución tampón (B) es de 1:1 a 1:5; y en donde en el paso (b) el alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado añadido a la suspensión tiene una temperatura de aproximadamente -5° C a 15° C.

50 En la presente se describen procesos para obtener Apo A-I a partir de una fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A), que comprende los pasos de: (a) suspender una fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) en una solución tampón (B) que comprende del 15 al 30% de un alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado (p/p), en donde la fracción de proteínas que contiene Apo A-I suspendida (A) tiene un pH en el intervalo de 6,4 a 10,0, y (b) eliminar las impurezas de la suspensión a la vez que se mantienen las proteínas Apo A-I solubilizadas. En realizaciones particulares, al paso (b) le sigue (c) precipitar Apo A-I de la suspensión y, opcionalmente, (d) recoger el precipitado de Apo A-I.

55

60 En el contexto de los procesos descritos en la presente, el término "suspender una fracción de proteínas que contiene Apo A-I" significa solubilizar la fracción de proteínas que contiene Apo-I, poniendo de este modo en solución por lo menos una parte importante de la fracción de proteínas.

65 Sorprendentemente, se ha descubierto que si la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) se solubiliza en un volumen de solución tampón (B) que comprende del 15 al 30% de un alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado (p/p) en donde la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) suspendida tiene un pH en el intervalo de 6,4 a 10,0, incluyendo de 6,4 a 7,5 o de 8,1 a 8,5, pueden suspenderse muchas más proteínas Apo A-I en un volumen de

tampón dado que con los métodos anteriormente conocidos, incluso sin la adición de sustancias caotrópicas como la urea. Por lo tanto, la cantidad de Apo A-I obtenida a partir de la fracción de partida (A) puede aumentarse sustancialmente en comparación con los métodos conocidos anteriormente.

5 Estos descubrimientos son particularmente destacables, ya que de acuerdo con el estado de la técnica, las concentraciones de alcohol en el intervalo del 15 al 30% (p/p) son insuficientes para solubilizar las proteínas Apo A-I, lo que lleva a rendimientos muy bajos.

10 Contrariamente a estas expectativas, en algunas realizaciones, la combinación única de pH y concentración de alcohol de acuerdo con los procesos descritos en la presente logra Apo A-I purificada con un rendimiento de Apo A-I de por lo menos 0,50 gramos/litro de plasma (g/l de plasma). En algunas realizaciones, se obtienen por lo menos 0,60 g/l de plasma de Apo A-I mediante los procesos descritos en la presente (en el paso b). Por el contrario, cuando la cantidad de etanol supera el 30% p/p, la recuperación de Apo A-I es menor. Por ejemplo, al 45% p/p, la recuperación de Apo A-I es de aproximadamente 0,12 g/l de plasma, lo que indica que los métodos descritos en la  
15 presente pueden aumentar las recuperaciones de Apo A-I en por lo menos un 300%.

Los procesos descritos en la presente proporcionan una forma más sencilla y económica de solubilizar Apo A-I que los sugeridos en la técnica relacionada. Además, el riesgo de explosión reducido debido al uso de concentraciones más bajas del alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado ofrece ventajas de costos más bajos con respecto a la construcción de la unidad de fabricación para el paso de precipitación.  
20

Además, en las realizaciones en las que el intervalo de pH de la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) suspendida es de 6,4 a 9,0, se cree que este nivel de pH evita la desamidación de las proteínas, lo que lleva a un riesgo reducido de que los fármacos biofarmacéuticos resultantes sean inmunogénicos. En algunas realizaciones, la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) suspendida tiene un pH en el intervalo de 6,4 a 9,0, incluyendo de 7,2 a 8,8, o de 8,0 a 8,6, o de 8,1 a 8,5, o de 8,2 a 8,4, o de 6,4 a 7,4.  
25

Los procesos descritos en la presente son rápidos, robustos, específicos y seguros, y proporcionan un rendimiento y pureza mejorados del producto de interés durante el procesamiento. Por lo tanto, los procesos descritos en la presente son particularmente adecuados para su uso en la purificación a gran escala de Apo A-I. Adecuado para la purificación a gran escala en el contexto de esta divulgación significa purificación a partir de decenas de kilogramos de un material de partida como una fracción de plasma humano, por ejemplo a partir de 50 kilogramos o más, como 500 kilogramos, de una proteína Apo A-I que contiene fracción de partida.  
30

Como se usa en la presente, "plasma" se refiere a componentes sanguíneos líquidos e incluye derivados de plasma y composiciones que contienen plasma.  
35

Los presentes procesos facilitan por tanto un equilibrio mejorado y aceptable entre el rendimiento del producto y la economía implicada, en comparación con los métodos usados convencionalmente.  
40

Ahora se ilustrarán los procesos con respecto a realizaciones específicas. Debe entenderse a partir de la siguiente descripción que la divulgación incluye todas las permutaciones y combinaciones de las diferentes realizaciones de los diferentes pasos, componentes y parámetros ilustrados a continuación.  
45

En los métodos descritos en la presente puede usarse cualquier material de partida que comprenda Apo A-I, como cualquier material de partida que contenga una cantidad sustancial de Apo A-I, como cualquier mezcla no purificada de proteínas que contenga una cantidad sustancial de Apo A-I.  
50

El término "Apo A-I" se refiere a proteínas Apo A-I y fracciones de las mismas. Típicamente, la apolipoproteína A-I es o una apolipoproteína A-I derivada de plasma o recombinante como Apo A-I, pro-apo-A1 o una variante como Apo A-I Milano o las denominadas formas resistentes a la oxidación como 4WF. En algunas realizaciones, la apolipoproteína A-I es Apo A-I derivada de plasma. También se contemplan fragmentos biológicamente activos de la apolipoproteína A-I. Los fragmentos pueden ser de origen natural, sintéticos químicos o recombinantes.  
55

En la invención según se reivindica, la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) es una Fracción IV de plasma (a veces también denominada Precipitado IV o similar), por ejemplo, obtenida por fraccionamiento con etanol frío de plasma humano de acuerdo con el método de fraccionamiento de Cohn o el método de Kistler y Nitschmann u otros métodos similares. También se divulgan realizaciones en las que la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) es una Fracción IV-I de plasma o una Fracción IV<sub>1</sub> de Cohn o una Fracción IV<sub>4</sub> de Cohn o una fracción similar. Otros ejemplos pueden incluir precipitados de sulfato de amonio que contienen Apo A-I. Cuando se usa la fracción de plasma IV como materia prima, los procesos descritos en la presente ofrecen la ventaja de hacer un uso completo de los recursos de plasma. En la invención, el material de partida es una Fracción IV. En realizaciones específicas adicionales, el material de partida se deriva de un precipitado de la Fracción IV. Otras fracciones de proteína que contienen Apo A-I (A) pueden incluir aquellas en las que se ha eliminado con anterioridad la alfa-1-antitripsina (AAT)  
60  
65

para su fabricación por separado en un producto terapéutico AAT, como Zemaira™. Ejemplos de tales fracciones de proteína que contienen Apo A-I se describen en la WO 2009/025754. La AAT puede separarse de la Apo A-I i) tratando una fracción de plasma humano de partida que comprende Apo A-I y AAT para separar una fracción que contiene Apo A-I de una fracción que contiene AAT, que comprende a) tratar opcionalmente la fracción de plasma humano de partida que se usa como el material de partida de tal manera que se solubilizan tanto la Apo A-I como la AAT; b) precipitar la Apo A-I solubilizada añadiendo etanol a una concentración del 8-14% v/v y ajustando el pH a de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 de tal manera que precipite la Apo A-I y la AAT permanezca en solución; y c) separar la Apo A-I precipitada de la solución que contiene AAT. Esta Apo A-I precipitada, en realizaciones particulares de la presente divulgación, es la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A). En el método de la invención, la fracción de plasma humano de partida que comprende AAT y Apo A-I puede seleccionarse de una o más de la Fracción IV (a veces también denominada Precipitado IV o similar) obtenida por fraccionamiento con etanol frío de plasma humano de acuerdo con el método de fraccionamiento de Cohn o el método de Kistler y Nitschmann u otros métodos similares. En algunos casos, estas fracciones pueden denominarse fracciones IV de Cohn, precipitados de los sobrenadantes A y A+1 de Kistler-Nitschmann (por ejemplo, precipitado A + IV). También se divulgan precipitados de sulfato de amonio que contienen AAT y Apo A-I. En algunas realizaciones, la fracción de proteínas que contiene Apo A-I comprende un dióxido de silicio finamente dividido, como Aerosil™.

La fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) se suspende en una solución tampón (B) que comprende del 15 al 30% de un alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado (p/p) y la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) suspendida tiene un pH en el intervalo de 6.4 a 10.0. En algunas realizaciones, el pH de la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) suspendida se ajusta en el intervalo de 6.4 a 10.0 después de que la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) se haya suspendido en la solución tampón (B).

En algunas realizaciones, la solución tampón (B) para solubilizar la fracción de proteínas Apo A-I (A) comprende del 16 al 28%, o del 17 al 26%, o del 18 al 24% o del 19 al 22% del alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado (p/p).

En algunas realizaciones, la solución tampón (B) para solubilizar la fracción de proteínas Apo A-I (A) comprende un 20% del alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado (p/p). Esta baja concentración de alcohol en comparación con los métodos del estado de la técnica no solo es beneficiosa desde un punto de vista económico, sino que también permite solubilizar una mayor cantidad de la fracción de proteínas Apo A-I (A), aumentando el rendimiento general de Apo A-I purificada a partir de una cantidad dada de material de partida.

En la invención según se reivindica, la solución tampón (B) tiene un pH en el intervalo de 6,4 a 10,0, incluyendo de 6,4 a 9,0 o de 7,2 a 8,8 o de 8,0 a 8,6 o de 6,4 a 7,4. En realizaciones más específicas, el pH de la solución tampón (B) está en el intervalo de 8,1 a 8,5, como 8,3. Se cree que estos intervalos de pH minimizan la desaminación y la desnaturalización de las proteínas Apo A-I.

En otras realizaciones más específicas, el pH de la solución tampón (B) está en el intervalo de 7,0 a 7,4, como 7,3. Se cree que este intervalo de pH minimiza la desaminación y la desnaturalización de las proteínas Apo A-I.

La solución tampón (B) puede prepararse con cualquier sal adecuada. Una sal adecuada para preparar la solución tampón (B) es NaHCO<sub>3</sub>. El NaHCO<sub>3</sub> tiene un precio bajo y está disponible comercialmente en grandes cantidades y, por lo tanto, es muy adecuado para aplicaciones a escala industrial. En la invención según se reivindica, la solución tampón (B) comprende NaHCO<sub>3</sub> de 5 mM a 35 mM, como NaHCO<sub>3</sub> 15 mM o 25 mM. Se ha demostrado que estas condiciones de tampón son particularmente eficaces para solubilizar la fracción de proteínas Apo A-I (A). Además, NaHCO<sub>3</sub> es particularmente ventajoso debido a su baja toxicidad y facilidad de uso. Sin embargo, también pueden usarse otros agentes tampón adecuados. La elección del agente tampón debe tener en cuenta que el agente en particular debe ser biológicamente compatible y poseer buenas propiedades de solubilidad en soluciones acuosas/alcohólicas.

Por razones de precio, toxicidad y aplicabilidad industrial, el alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado es el etanol. El etanol tiene la ventaja adicional de ser fácil de manejar y también de ser adecuado para aplicaciones industriales. Aparte del etanol, otros alcoholes como metanol, n-propanol o isopropanol, n-butanol, sec-butanol, isobutanol o terc-butanol son adecuados para su uso en los procesos descritos en la presente.

El etanol es típicamente cualquier etanol de calidad farmacéutica. En realizaciones particulares de la invención, el etanol es un etanol de calidad farmacéutica al 96% (por ejemplo, 94% de etanol y 2% de metiletilcetona (MEK)). En realizaciones particulares de la invención, el etanol es un etanol de calidad farmacéutica al 95% (3A que contiene un 5% de metanol).

Para minimizar la activación del factor de coagulación y de la proteasa, la temperatura de la suspensión de la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) (como por ejemplo la fracción IV) en el tampón (B) se enfría a 1,0 ± 0,5° C en el plazo de aproximadamente 90 minutos desde que el tampón (B) entra en contacto con la fracción de

proteínas que contiene Apo A-I (A). En realizaciones particulares, la suspensión se enfría a  $1,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  en el plazo de aproximadamente 60 minutos desde que el tampón B entra en contacto con la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) (por ejemplo, la Fracción IV).

5 En algunas realizaciones, después de suspender la fracción de Apo A-I (A) en el tampón (B), el pH de la suspensión se ajusta, si es necesario, para que esté en el intervalo de 6,4 a 10,0, como en el intervalo de 7,0 a 7,4, como 7,3 o como en el intervalo de 8,1 a 8,5, como 8,3.

10 Para facilitar la suspensión de Apo A-I en el tampón (B), el tampón (B) puede tener una temperatura de aproximadamente  $10^{\circ}\text{C}$  a  $26^{\circ}\text{C}$ , incluyendo de aproximadamente  $10^{\circ}\text{C}$  a  $16^{\circ}\text{C}$ , como aproximadamente  $13^{\circ}\text{C}$ , cuando se pone en contacto con la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A).

15 La proporción de volumen de la fracción de proteínas (A) a la solución tampón (B) es de 1:1 a 1:5, como 1:2. El uso de proporciones de volumen bajas de fracción Apo A-I (A) a solución tampón (B) es particularmente beneficioso en la producción a escala industrial para reducir los costos de material y almacenamiento de la solución tampón.

20 En algunas realizaciones, la conductividad de la suspensión es menor de 5 mS/cm, como en el intervalo de 0,5 a 1,0 mS/cm.

25 Como se ha descrito anteriormente, después de la solubilización de la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) en la solución tampón (B), se eliminan de la suspensión las impurezas como otras proteínas no deseadas u otros componentes presentes en la fracción de proteínas Apo A-I (A), mientras que las proteínas Apo A-I se mantienen en solución (paso (b)). En algunas realizaciones, las impurezas se precipitan mediante la adición de alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado a una concentración de alcohol del 45 al 65% (p/p), como 50% (p/p) o 60% (p/p). Se cree que este intervalo es eficaz para solubilizar muchos componentes proteicos excepto Apo A-I. Por lo tanto, este paso de purificación ofrece una forma muy específica y eficaz de separar la Apo A-I de otros componentes no deseados.

30 Para facilitar la precipitación de impurezas, el alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado añadido a la suspensión puede tener una temperatura de aproximadamente  $-5^{\circ}\text{C}$  a  $15^{\circ}\text{C}$ , como aproximadamente  $5^{\circ}\text{C}$ .

35 En algunas realizaciones, el alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado es etanol. En realizaciones particulares, la concentración de etanol está en el intervalo del 55% al 65% (p/p).

El pH se mantiene en el intervalo de 6,4 a 10. En algunas realizaciones, el pH está en el intervalo de 6,4 a 9,0, incluyendo de 7,2 a 8,8, o de 8,0 a 8,6, o de 8,1 a 8,5, o de 8,2 a 8,4. o de 6,4 a 7,4.

40 En algunas realizaciones, las impurezas precipitadas se eliminan de la suspensión mediante cualquier proceso conocido, como filtración, centrifugación, decantación, ultrafiltración y/o sedimentación. En algunas realizaciones, las impurezas se eliminan por filtración. De acuerdo con estas realizaciones, los filtros pueden elegirse específicamente para retener las impurezas precipitadas pero no el producto deseado, por ejemplo, no las proteínas Apo A-I deseadas. Los filtros útiles en tales procesos incluyen láminas de filtro de polipropileno y láminas de filtro de celulosa CH9.

45 En algunas realizaciones, después de eliminar las impurezas, la Apo A-I se precipita de la suspensión (paso (c)). Esta precipitación de Apo A-I puede efectuarse ajustando el pH de la suspensión a un pH en el intervalo de 4,6 a 5,6, como 5,4. En este intervalo de pH, se cree que la precipitación de Apo A-I es altamente selectiva, de tal manera que puedan mantenerse en solución otras proteínas no deseadas.

50 En algunas realizaciones, la temperatura de la suspensión se ajusta (si es necesario) a un intervalo de  $-2$  a  $20^{\circ}\text{C}$ , para precipitar Apo A-I.

55 En algunas realizaciones, el precipitado de Apo A-I se recoge (paso (d)). De acuerdo con estas realizaciones, después de precipitar la Apo A-I, puede añadirse a la suspensión un auxiliar de filtración que facilita el paso del líquido a través del filtro. Los auxiliares de filtración son polvos minerales inorgánicos o materiales fibrosos orgánicos que se usan en combinación con hardware de filtración para mejorar el rendimiento de la filtración. Los auxiliares de filtración comúnmente encontrados incluyen diatomita, perlita y celulosa. Los auxiliares de filtrado adecuados son conocidos en la técnica e incluyen el auxiliar de filtración Celite™ 574.

60 En algunas realizaciones, el precipitado de Apo A-I se recoge mediante cualquier método adecuado, como los indicados anteriormente para la filtración de impurezas. En algunas realizaciones, el precipitado de Apo A-I se recoge por filtración. De acuerdo con estas realizaciones, los filtros pueden elegirse de tal manera que se retengan las proteínas Apo A-I deseadas, mientras que otros componentes más pequeños pasan a través de los poros del filtro.

65

En realizaciones específicas, el proceso comprende además usar una solución de lavado para eliminar las impurezas de la Apo A-I precipitada. La solución de lavado puede ser agua o un tampón de lavado adecuado. Si se usa un paso de lavado, el lavado se lleva a cabo de tal manera que las proteínas Apo A-I permanezcan en el filtro, mientras que las impurezas se disuelven y eliminan por lavado.

De acuerdo con realizaciones específicas adicionales, el proceso comprende un paso adicional (e), en el que el precipitado de Apo A-I recogido se elimina de los lípidos, por ejemplo mediante la adición de alcohol, por ejemplo, etanol a una concentración dentro del intervalo de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 96% de etanol (p/p). "Deslipidado" en el contexto de los procesos descritos en la presente significa la eliminación de lípidos, reduciendo por tanto el contenido de lípidos del producto de Apo A-I.

El precipitado de Apo A-I deslipidado (una Apo A-I purificada) puede almacenarse a  $-20^{\circ}$  C o menos durante un período de hasta un año sin pérdida de la funcionalidad de las proteínas.

La Apo A-I derivada de los procesos de la presente invención puede someterse adicionalmente a pasos de reducción de virus dedicados (inactivación de virus y/o eliminación de virus) para garantizar la eliminación de patógenos de virus. Las tecnologías comunes de inactivación de virus incluyen métodos físicos como el procedimiento de pasteurización clásico (calentamiento a  $60^{\circ}$  C durante 10 horas), irradiación de luz ultravioleta de longitud de onda corta o radiación gamma y métodos químicos como detergente solvente o incubación a pH bajo. Las tecnologías de eliminación de virus incluyen métodos de exclusión por tamaño, como la filtración de virus, que a menudo también se conoce como nanofiltración. Se ha demostrado que estos métodos de filtración de virus son métodos eficaces para eliminar virus de soluciones de proteínas. En algunas realizaciones, la Apo A-I purificada de la presente invención se somete a un procedimiento de reducción de virus como inactivación por calor y/o filtración de virus como se describe en la EP13179755.7.

La presente divulgación proporciona una Apo A-I purificada caracterizada por las siguientes propiedades:

- (a) menos de 0,3 mg de IgA por gramo de Apo A-I;
- (b) menos de 0,7 mg de IgG por gramo de Apo A-I;
- (c) menos de 0,05 mg de IgM por gramo de Apo A-I;
- (d) menos de 4,9 mg de haptoglobina por gramo de Apo A-I;
- (e) menos de 2,7 mg de hemopexina por gramo de Apo A-I;
- (f) menos de 6,4 mg de fibrinógeno por gramo de Apo A-I;
- (g) menos de 0,9 mg de ceruloplasmina por gramo de Apo A-I;
- (h) menos de 14,6 mg de albúmina por gramo de Apo A-I;
- (i) menos de 2,3 mg de alfa-2-macroglobulina por gramo de Apo A-I;
- (j) menos de 12 mg de alfa-1-antitripsina por gramo de Apo A-I; y
- (k) menos de 3,9 mg de transferrina por gramo de Apo A-I.

El contenido de las proteínas puede determinarse por nefelometría. El contenido de Apo A-I también puede determinarse mediante electroforesis capilar de alto rendimiento.

En otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona una Apo A-I purificada que comprende: (a) menos de 0,3 mg de IgA por gramo de Apo A-I. En realizaciones particulares, la preparación de Apo A-I comprende menos de 0,2 mg de IgA por gramo de Apo A-I; o menos de 0,1 mg de IgA por gramo de Apo A-I; o menos de 0,075 mg de IgA por gramo de Apo A-I; o menos de 0,05 mg de IgA por gramo de Apo A-I; o menos de 0,02 mg de IgA por gramo de Apo A-I. Es ventajoso tener un nivel de pureza de IgA bajo ya que puede afectar potencialmente al perfil de seguridad de las preparaciones farmacéuticas que comprenden la preparación de Apo A-I con niveles más bajos deseables para minimizar el riesgo de formación de anti-IgA en pacientes con deficiencia de IgA. Esta afección es la deficiencia primaria de anticuerpos más común afectando a aproximadamente 1:133 personas y como la afección es relativamente leve, a menudo no se reconoce en las personas afectadas.

La Apo A-I purificada como se ha descrito anteriormente en la presente puede formularse en composiciones farmacéuticas, como HDL reconstituida para uso terapéutico. Dichas composiciones farmacéuticas pueden incluir un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos no limitativos de portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen agua, emulsionantes, aglutinantes, cargas, surfactantes, tampones, estabilizantes, sales, alcoholes y polioles, detergentes, proteínas y péptidos, lípidos, gomas, azúcares y otros carbohidratos, aunque sin limitación a los mismos.

La HDL reconstituida puede, además de Apo-AI, comprender uno o más de un lípido, un detergente y un estabilizador, aunque sin limitación a los mismos. Los ejemplos no limitativos de lípidos incluyen fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol, ácidos grasos y/o triglicéridos. Preferiblemente, el lípido es un fosfolípido. Los ejemplos no limitativos de fosfolípidos incluyen fosfatidilcolina (PC) (lecitina), ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina (PE) (cefalina), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y esfingomielina (SM) o derivados

naturales o sintéticos de los mismos. Los estabilizadores pueden ser un carbohidrato como un azúcar (por ejemplo, sacarosa) o un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol o sorbitol), aunque sin limitación a los mismos. Si está presente, el detergente puede ser cualquier detergente iónico (por ejemplo, catiónico, aniónico, zwitteriónico) o detergente no iónico, incluyendo ácidos biliares y sales de los mismos, como colato de sodio.

5 Los usos terapéuticos de las formulaciones de Apo A-1 y/o HDL reconstituidas pueden incluir el tratamiento o la profilaxis de enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, síndrome coronario agudo (ACS, aterosclerosis e infarto de miocardio) o enfermedades, trastornos o afecciones como diabetes, ataque cerebral o infarto de miocardio que predisponen a la ACS, hipercolesterolemia (por ejemplo, colesterol en suero elevado o colesterol LDL elevado) e hipocolesterolemia resultante de niveles reducidos de lipoproteína de alta densidad (HDL), como es sintomático de la enfermedad de Tangier.

#### Ejemplos

15 Como se ha indicado anteriormente, puede usarse cualquier mezcla no purificada de proteínas que contenga una cantidad sustancial de Apo A-I como material de partida para los procesos de purificación descritos en la presente.

20 En los siguientes ejemplos, la Apo A-I se extrae del plasma humano, usando fraccionamiento con etanol frío de acuerdo con los métodos de fraccionamiento de Cohn o los métodos de Kistler y Nitschmaun, proporcionando la fracción de plasma IV-I o IV como material de partida. En el paso (a), la fracción IV se suspende en solución tampón (B) y luego se ajusta el pH antes de la exposición a una mayor concentración de etanol para precipitar varias impurezas en el paso (b). Las impurezas se eliminan por filtración profunda en presencia de un auxiliar de filtración y luego el pH se desplaza cerca del punto isoeléctrico de la Apo A-I para precipitar la Apo A-I, como en el paso (c). Se añade un auxiliar de filtración y el precipitado de Apo A-I se recoge por filtración en el paso (d). Opcionalmente, el precipitado de Apo A-I puede volverse a suspender y se añade etanol (por ejemplo, 40-96% p/p) para eliminar los lípidos residuales, como en el paso (e).

30 El contenido de Apo A-I en varios puntos de muestreo se midió usando electroforesis capilar.

La pureza se expresó como porcentaje, se midió usando electroforesis capilar y también se evaluó visualmente en geles SDS-PAGE.

#### Ejemplo 1: Preparación del Precipitado de la Fracción IV

35 El plasma humano se enfrió a aproximadamente 0° C y se ajustó a un pH de aproximadamente 7,2. Se añadió etanol frío hasta una concentración de aproximadamente el 8% (p/p), y la temperatura se redujo a aproximadamente -2° C. El precipitado que se formó (Fracción I) se eliminó por centrifugación o filtración.

40 El filtrado o sobrenadante del procedimiento anterior se ajustó a un pH de aproximadamente 6,9 y se añadió etanol frío a una concentración de aproximadamente el 20% (p/p). Luego se bajó la temperatura a -5° C, y la mezcla se sometió de nuevo a centrifugación o filtración. El precipitado que se formó (Fracción II + III) se reservó para otros propósitos.

45 El filtrado o sobrenadante del procedimiento anterior se ajustó a un pH de aproximadamente 5 y la concentración de etanol se ajustó a aproximadamente el 20% (p/p). La temperatura se ajustó a aproximadamente -5° C. El precipitado que se formó (Fracción IV) se eliminó por centrifugación o filtración y se almacenó hasta que se necesitó en forma de pasta. Esta pasta de la Fracción IV contiene Apo A-I, así como proteínas y lípidos contaminantes.

#### Ejemplo 2: Factores que afectan la recuperación de Apo A-I del Precipitado IV

50 Los experimentos iniciales que usan una metodología de Diseño de Experimento (DOE) se centraron en la disolución del Precipitado IV (por ejemplo, que contiene la Fracción IV) en un tampón de bicarbonato de sodio, con el objetivo de solubilizar más ApoA-I. La Tabla 1 resume las condiciones de los seis parámetros de proceso usados para el diseño de Plackett-Burman con series de punto central. Los parámetros examinados incluyeron volumen de tampón, concentración de etanol, temperatura, pH y tiempo de mezcla. Se realizaron trece series en la selección inicial del paso de solubilización del Precipitado IV.

60 Se disolvió una alícuota de pasta del Precipitado IV en un volumen de tampón como se especifica en el diseño de DOE. Luego, se ajustó el pH de acuerdo con el diseño del DOE, después de lo cual se mezcló la suspensión a la temperatura asignada para esa serie. Se tomó una muestra de la suspensión y se centrifugó durante quince minutos a 4.500 rpm. El sobrenadante resultante se envió para su análisis. Los resultados de las pruebas se normalizaron y expresaron como g de Apo A-I/L de plasma.

65

**Tabla 1: La matriz de diseño de detección de Plackett-Burman para la disolución del Precipitado IV.**

Orden de serie estándar	Volumen de tampón	Cono de tampón (mM)	Cono de etanol (%)	Temp. (° C)	pH	Tiempo de mezcla (min)
1	5	35	20	20	6.4	1
2	2	35	60	20	6.4	4
3	2	5	20	20	7.2	4
4	2	35	20	0	6.4	4
5	2	5	60	20	7.2	1
6	5	5	60	0	6.4	1
7	5	35	60	0	7.2	4
8	5	5	60	20	6.4	4
9	5	5	20	0	7.2	4
10	2	35	60	0	7.2	1
11	5	35	20	20	7.2	1
12	2	5	20	0	6.4	1
13	3.5	20	40	10	6.8	2.5

La Tabla 2 es un resumen de los resultados obtenidos para el DOE de selección inicial de Plackett-Burman, donde el rendimiento de ApoA-I se normalizó y se expresó como g de ApoA-I/l de plasma.

El análisis Minitab16 DOE concluyó que solo la concentración de etanol tenía una  $p < 0,05$  para el rendimiento, donde cuanto menor era la concentración de etanol en el tampón de resuspensión, más ApoA-I se solubilizaba (Figura 1).

**Tabla 2: Resultados de la matriz de diseño de selección de Plackett-Burman para la disolución del Precipitado IV.**

Orden de serie estándar	Rendimiento (g/l PEQ)
1	0.71
2	0.36
3	1.04
4	0,69
5	0.51
6	0.41
7	0.48
8	0.53
9	0.72
10	0.49
11	0.86
12	0.85
13	0.80

Ejemplo 3: Efecto de la concentración de etanol y el pH sobre la recuperación de Apo A-I del Precipitado IV

El estudio incluyó 10 series en las que se varió la concentración de etanol entre el 20 y el 50% y el pH entre 6,4 y 7,2. El estudio se realizó como un diseño DOE factorial completo duplicado  $2^2$  con una serie de punto central (Tabla 3). El método implicaba disolver una alícuota de la pasta de Precipitado IV en 2 partes de tampón de  $\text{NaHCO}_3$  15 mM con concentraciones de etanol de acuerdo con el DOE. Luego, se ajustó el pH de acuerdo con el diseño del DOE, después de lo cual se ajustó la suspensión a una temperatura de  $0 \pm 1^\circ \text{C}$  y se mezcló durante una hora. Se tomó una muestra de la suspensión y se centrifugó durante quince minutos a 4.500 rpm. El sobrenadante resultante se envió para su análisis. Los resultados de las pruebas se normalizaron y expresaron como g de ApoA-I/L de plasma.

**Tabla 3: La matriz de diseño DOE de optimización factorial completa  $2^2$  para la disolución del Precipitado IV.**

Orden de serie estándar	Concentración de etanol (%)	pH
1	50	6.4
2	20	6.4
3	35	6.8

(continuación)

Orden de serie estándar	Concentración de etanol (%)	pH
4	20	7.2
5	50	7.2
6	50	7.2
7	20	6.4
8	50	6.4
9	20	7.2
10	35	6.8

El análisis DOE de Minitab16 concluyó que el único factor que tenía un  $p < 0,05$  para el rendimiento era la concentración de etanol (Tabla 4). Los resultados indican que a menor concentración de etanol en el tampón de resuspensión, se observa mayor ApoA-I solubilizada con mayor rendimiento cuando la concentración de etanol estaba entre el 20 y el 30% (Figura 2). El pH de la solución de resuspensión mostró un efecto menor al aumentar el pH de 6,4 a 7,2, lo que dio como resultado mayores recuperaciones de Apo A-I. Sin embargo, no se encontró que esto fuera significativo ( $p = 0,113$ ).

**Tabla 4: Resultados del diseño de optimización factorial completo  $2^2$  para la disolución del Precipitado IV.**

Orden de serie estándar	Rendimiento (g/L de PEQ)
1	0,62
2	0.84
3	0.82
4	0.87
5	0,69
6	0.74
7	0.83
8	0.72
9	0.86
10	0.92

La Fig. 3 muestra adicionalmente la influencia del pH sobre el rendimiento de Apo A-I cuando se usa una concentración de etanol dentro del intervalo del 20 al 50%. El rendimiento se maximiza cuando la Apo A-I se suspende en una solución tampón (B) como se describe en la presente, que comprende etanol a una concentración dentro del intervalo del 15 al 30% y un pH dentro del intervalo de 6.4 a 7.2.

Ejemplo 4: Efecto de la concentración de etanol sobre la recuperación de Apo A-I del Precipitado IV.

Se realizó un experimento lineal para determinar a qué concentración de etanol se maximizaba el rendimiento de ApoA-I durante el paso de solubilización. Se probaron por duplicado concentraciones de etanol del 0, 15 y del 30%, como se ha descrito anteriormente. La Tabla 5 es un resumen de los resultados obtenidos para el experimento de concentración lineal de etanol donde se normalizó el rendimiento de ApoA-I y se expresa como g ApoA-I/L de plasma y la pureza se expresa como un porcentaje.

**Tabla 5: Resultados del experimento de concentración lineal de etanol para la disolución del Precipitado IV.**

Orden de serie estándar	Cono de etanol (%)	Rendimiento (g/L de PEQ)
1	0	0.47
2	15	0.91
3	30	0.84
4	30	0.83
5	15	0.80
6	0	0.48

Como se muestra en la Fig. 4, el rendimiento de Apo A-I obtenido a partir de plasma se maximiza cuando se usa una solución tampón (B) que comprende etanol a una concentración dentro del intervalo del 15 y 30%.

Ejemplo 5: Efecto de la concentración de etanol y el pH sobre la recuperación de Apo A-I del Precipitado IV

El precipitado IV se disolvió en dos partes de tampón de suspensión elaborado con  $\text{NaHCO}_3$  15 mM, EDTA 0,5 mM a varias concentraciones de etanol de acuerdo con la Tabla 6, después de lo cual se ajustó el pH usando HCl 0,5 M o NaOH 0,5 M de acuerdo con la Tabla 6.

Después de ajustar el pH, se tomó una muestra de la suspensión y se centrifugó durante quince minutos a 4.500 rpm. El sobrenadante resultante se envió para su análisis. Los resultados se normalizaron y se expresan en g de apoA-I/L de plasma.

Estudios anteriores habían demostrado que durante el paso de resuspensión del Precipitado IV, el rendimiento de Apo A-I se maximizaba cuando se usaba una concentración de etanol del 15%-30% en el tampón de suspensión. Se descubrió que el pH de la resuspensión tenía solo un efecto menor, sin embargo, el intervalo examinado era estrecho, pH 6,4-pH 7,2. Para determinar si un intervalo de pH más amplio afectaba al rendimiento de Apo A-I, se realizaron experimentos de acuerdo con la Tabla 6 y se calculó el rendimiento de Apo A-I.

**Tabla 6: Tampón de resuspensión y condiciones de pH.**

Nº de experimento	Tampón de suspensión	pH
1470.E009.08	15% de Etanol	5.0
1470-E009.09	15% de Etanol	10.0
1470.E003.10	30% de Etanol	5.0
1470.E009.11	30% de Etanol	10.0
1470.E009.12	20% de Etanol	7.4

Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla 7. A pH 5,0, el rendimiento de Apo A-I fue indetectable independientemente de la concentración de etanol. La disolución en etanol al 20%, pH 7,4 y pH 10,0 en presencia de etanol al 15% o al 30% proporcionó niveles similares de recuperación de Apo A-I (paso b) (Tabla 7).

**Tabla 7: Resultados del experimento de concentración de etanol y pH para la disolución del Precipitado IV.**

Parámetros	EtOH al 15% pH 5,0	EtOH al 15% pH 10,0	EtOH al 30% pH 5,0	EtOH al 30% pH 10,0	EtOH al 20% pH 7,4
Rendimiento (g de APO A-I/L de Plasma)	N/A	0.72	N/A	0.75	0.73
N/A. - Niveles indetectables de Apo A-I					

Ejemplo 6: Actividad de proteasa y factores de coagulación activados en Apo A-I recuperada

La purificación de Apo A-I implica la precipitación de Apo A-I y la determinación de la actividad proteolítica y la presencia de factores de coagulación activados en el precipitado de Apo A-I del paso (d).

Se disolvió una alícuota de la pasta de Precipitado IV en 2 partes de un tampón de suspensión (B) (tampón de NaHCO<sub>3</sub> 15 mM/etanol al 20%). La suspensión se ajustó a una temperatura de 0 ± 1° C. Los dispositivos de enfriamiento se programaron para que la suspensión alcanzara una temperatura objetivo de 1° C en 10, 65 o 120 minutos. Luego, la suspensión se mezcló a esa temperatura (aproximadamente 0 ± 1° C) durante aproximadamente una hora. Después del mezclado, se ajustó el pH de la suspensión usando solución de NaOH 0,5 M o HCl 0,5 M para proporcionar un pH de aproximadamente 7,3.

Se añadió etanol preenfriado a -4° C hasta una concentración final del 60% mientras se mantenía la temperatura de la suspensión a entre -1 y 2° C. Después de la adición de etanol, la suspensión se mezcló durante aproximadamente 30 minutos.

Después de la incubación, se añadió auxiliar de filtración a la suspensión. El material de Apo A-I soluble (filtrado de Apo A-I) se separó de las impurezas insolubles mediante filtración a través de un filtro profundo que se había prelavado con NaHCO<sub>3</sub> 15 mM/etanol al 60%. La torta del filtro se lavó con NaHCO<sub>3</sub> 15 mM/etanol al 60%.

Se añadió una cantidad de solución de HCl 0,5 M al filtrado de Apo A-1 para proporcionar una suspensión que tenía un pH de 5,4 ± 0,1. La temperatura de la suspensión se ajustó a aproximadamente 0° C y las condiciones de pH/temperatura se mantuvieron durante aproximadamente 2 horas.

Posteriormente, se añadió auxiliar de filtración a la suspensión y el precipitado de Apo A-I se recogió mediante filtración profunda. Los filtros de profundidad se prelavaron con etanol al 60%. Se realizó un postlavado inicial con etanol al 96% seguido de un postlavado con etanol al 20%.

Se analizó la actividad proteolítica del precipitado de la ApoA-I purificado y se midió el tiempo de coagulación del tiempo de tromboplastina parcial no activada (NaPTT). Estas pruebas proporcionan una indicación de la cantidad de proteasa residual en el precipitado de Apo A-I del paso (d).

Para preparar el precipitado de Apo A-I del paso (d) para las pruebas, se disolvió añadiendo una parte de precipitado a tres partes de tampón SDS al 2%/Tris 100 mM pH 8,5. Luego se mezcló la suspensión que contenía Apo A-I durante entre 45 minutos y 1 hora. Posteriormente, la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se usó para determinar la actividad proteolítica y NaPTT).

El ensayo de actividad proteolítica es un método colorimétrico en el que el sobrenadante que contiene Apo A-I se mezcla 1:3 con una solución tampón (pH 8,0). Luego, se añadió esta solución (200 µl) junto con 20 µl de un sustrato que contenía pNA a los pocillos de la placa de microtitulación. Luego, la placa se incubó a 37° C durante 10 minutos antes de una lectura inicial a 405 nm. La incubación continuó en las mismas condiciones con lecturas adicionales (405 nm) tomadas a los 30, 60 y 90 minutos. Al final de la incubación se calculó la actividad proteolítica (nkat/L) midiendo la cantidad de pNA formada entre 0 y 90 minutos.

La presencia de factores de coagulación activados en los lotes de precipitado de Apo A-I (del paso (d)) se analizó mediante un ensayo común de tiempo de tromboplastina parcial no activado (NaPTT) de acuerdo con Ph. Eur. monograph 2.6.22.

Los resultados indican que los niveles de actividad de proteasa y factores de coagulación activados en el precipitado de Apo A-I (en el paso (d)) pueden minimizarse acortando el tiempo necesario para reducir la temperatura a 1° C durante la resolubilización de la Fracción IV, en el paso (a) (Figura 3).

#### Ejemplo 7: Recuperación a gran escala de Apo A-I

Se fabricaron lotes a mayor escala (n=17) disolviendo la pasta de Precipitado IV (500-550 kg) en 2 partes de tampón NaHCO<sub>3</sub> 15 mM/etanol al 20%. Luego, la suspensión se ajustó a una temperatura de 0 ± 1° C y se mezcló durante aproximadamente una hora. Después de mezclar, el pH se ajustó a 7,3 usando o NaOH 0,5 M o HCl 0,5 M.

Se añadió etanol hasta una concentración final del 60% y la suspensión se mezcló durante aproximadamente 15 minutos. Luego, la suspensión se filtró a través de una prensa de filtro que se había prelavado con NaHCO<sub>3</sub> 15 mM/etanol al 60%. La torta de filtro resultante también se lavó con NaHCO<sub>3</sub> 15 mM/etanol al 60%.

Los resultados de las pruebas se normalizaron y expresaron como g de Apo A-I por L de plasma. A partir de 17 lotes, la recuperación media fue de 0,6 g/l (en el paso (b)).

#### Ejemplo 8: Purificación de Apo A-I de Fracción IV de Kistler-Nitschmann - efecto del pH durante la resuspensión

Se evaluó el efecto del pH en la resuspensión de Apo A-I del Precipitado IV sobre el rendimiento global de Apo A-I purificada variando el pH en el intervalo de 7,2-12,0.

El método para obtener Apo A-I purificada implicó disolver el Precipitado IV en dos partes de tampón de disolución de precipitado IV de EtOH al 20% que contenía carbonato de sodio 15 mM (22 ± 2° C). Después de la adición del tampón al Precipitado IV, la temperatura de la suspensión se redujo a 2° C (2 + 1° C) en aproximadamente 15 minutos. Después de mezclar durante aproximadamente 15 minutos, el pH de la suspensión se ajustó al pH objetivo en el intervalo de 7,2 a 12,0 antes de añadir etanol al 96% para lograr una concentración final del 60%.

La suspensión resultante se filtró en presencia de Celite 574. El pH del filtrado se redujo luego a aproximadamente pH 5,3 y se incubó durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 0° C. A continuación, se añadió el auxiliar de filtración, se mezcló la suspensión durante aproximadamente 30 minutos antes de filtrarla y se recogió el precipitado de Apo A-I. Luego, el precipitado de Apo A-I se deslipidó con etanol al 96%.

Para determinar el contenido de Apo A-I y otras características del precipitado de Apo A-I deslipidada, el precipitado se disolvió a temperatura ambiente durante 45 minutos en 3 partes de tampón Tris 100 mM, pH 8,5 que contenía SDS al 2%. Las muestras se centrifugaron antes del análisis.

Se investigó la influencia del pH en el paso de resuspensión del Precipitado IV sobre el rendimiento general de Apo A-I en el precipitado de Apo A-I deslipidado, obteniéndose niveles de recuperación más altos cuando se usaban condiciones de extracción de pH más altas (Tabla 8). La cantidad de Apo A-I se determinó mediante electroforesis capilar de alto rendimiento (Hewlett Packard 3D CE, Agilent Technology). La determinación se realiza en condiciones desnaturalizantes, es decir, en presencia de SDS. El contenido de Apo A-I puede entonces determinarse tanto en muestras acuosas como en muestras que contienen lípidos (por ejemplo, HDL reconstituida). Brevemente, se prepararon muestras (150 µl) que contenían aproximadamente 2-3 mg/ml de Apo A-I (si es necesario diluida con agua) con SDS al 16% (25 µl) y fenilalanina (25 µl, 2 o 4 mg/ml). Luego, las muestras se incubaron en un baño de agua hirviendo durante 3 minutos antes de la dilución 1:2,5 en un tampón de electroforesis (borato de sodio 50 mM, SDS al 0,2%, pH 9,1, 300 µl) y se filtraron (0,45 µm). Luego, las muestras se cargaron en un capilar de sílice fundido (56 cm por 50 µm de diámetro interior, Agilent G1600-61232). La electroforesis se llevó a

cabo a 25 kV. El estándar usado fue un estándar internacional de Apo A-I (BCR-393) y una curva estándar establecida de 20 a 950 µg/ml. La cuantificación se basa en las áreas de los picos relativos en comparación con el estándar interno (fenilalanina).

5 **Tabla 8:** Rendimiento de Apo A-I purificada (gramos por litro de plasma) en función del pH usado para extraer Apo A-I de la Fracción TV.

	<b>Lotes de producción</b>	<b>pH 7.3</b>	<b>pH 8.1</b>	<b>pH 8.3</b>	<b>pH 8.4</b>	<b>pH 8.5</b>	<b>pH 8.7</b>
<b>Rendimiento</b>	0.22	0.28	0.37	0.53	0.51	0.50	0.56

10 El nivel de otras proteínas del plasma en la preparación de Apo A-I purificada (mg de proteína plasmática por gramo de Apo A-I) se determinó mediante nefelometría (BN ProSpec, Siemens) con referencias, control y antisuero obtenidos de Siemens. Para el contenido de IgA se usó un kit N latex IgA de Siemens de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 El nivel de otras proteínas plasmáticas en las preparaciones de Apo A-I purificadas se mantuvo estable hasta que el pH del paso de extracción de la Fracción IV alcanzó un pH de 8,5. En condiciones de extracción de pH más alto, como pH 8,7, los niveles de proteínas plasmáticas aumentaron (Tabla 9).

20 **Tabla 9:** Niveles de impurezas en la Apo A-I purificada en función del pH usado para extraer la Apo A-I de la Fracción IV.

<b>Proteína plasmática</b>	<b>pH 7.3</b>	<b>pH 8.1</b>	<b>pH 8.3</b>	<b>pH 8.5</b>	<b>pH 8.7</b>
<b>(mg/g Apo A-I)</b>					
<b>Albúmina</b>	<10.1	<9.1	<10.2	<8.8	13.7
<b>Alfa-1. antitripsina</b>	2.1	8.1	9.5	10.8	46.7
<b>Alfa-2-macroglobulina</b>	<1.4	<1.2	<1.4	<1.2	<1.4
<b>Ceruloplasmina</b>	<0.6	<0.5	<0.6	<0.5	<0.6
<b>Fibrinógeno</b>	<4.6	<4.1	<4.6	<4.0	<4.5
<b>Haptoglobina</b>	<2.3	<2.0	<2.3	<2.0	5.4
<b>Hemopexina</b>	<1.6	<1.4	<1.6	<1.4	2.2
<b>IgA</b>	0.02	0.03	0.06	0.2	0.7
<b>IgG</b>	<0.1	<0.1	0.15	0.6	3.4
<b>IgM</b>	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
<b>Transferrina</b>	<2.6	<2.4	<2.6	3.0	15.4

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para obtener Apo A-I a partir de una fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A), que comprende:

- 5
- (a) suspender la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) en una solución tampón (B) que comprende del 15 al 30% de un alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado (p/p), en donde la fracción de proteínas que contiene Apo A-I suspendida (A) tiene un pH en el intervalo de 6.4 a 10.0,
- 10 (b) eliminar las impurezas de la suspensión a la vez que se mantienen solubilizadas las proteínas Apo A-I,
- (c) precipitar Apo A-I de la suspensión, y
- (d) recoger el precipitado de Apo A-I,

en donde la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) es una Fracción IV de plasma, el alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado es etanol; la solución tampón (B) comprende NaHCO<sub>3</sub> de 5 mM a 35 mM; en donde en el paso (a), la proporción de volumen de la fracción de proteínas Apo A-I (A) a la solución tampón (B) es de 1:1 a 1:5; y en donde en el paso (b) el alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado añadido a la suspensión tiene una temperatura de aproximadamente -5° C a 15° C.

20 2. El proceso de la reivindicación 1, en donde la solución tampón (B) comprende un 20% del alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado (p/p).

3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) suspendida tiene un pH en el intervalo de 7,2 a 8,8.

25 4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) suspendida tiene un pH en el intervalo de 8,1 a 8,5.

5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la fracción de proteínas que contiene Apo A-I (A) suspendida tiene un pH en el intervalo de 7,0 a 7,6.

30 6. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde en el paso (b), las impurezas se eliminan por precipitación añadiendo alcohol C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> lineal o ramificado a una concentración de alcohol del 55 al 65% (p/p).

35 7. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde en el paso (b), las impurezas se eliminan por precipitación seguido de filtración, centrifugación, decantación, ultrafiltración y/o sedimentación.

8. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde en el paso (c), el pH de la suspensión se ajusta en el intervalo de 4,6 a 5,6.

40 9. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde en el paso (c), la temperatura de la suspensión se ajusta de -2 a 20°C para precipitar la Apo A-I.

45 10. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además el paso (e), que comprende deslipidar el precipitado de Apo A-I recogido mediante la adición de etanol en el intervalo del 40 al 96% (p/p).

Figura 1

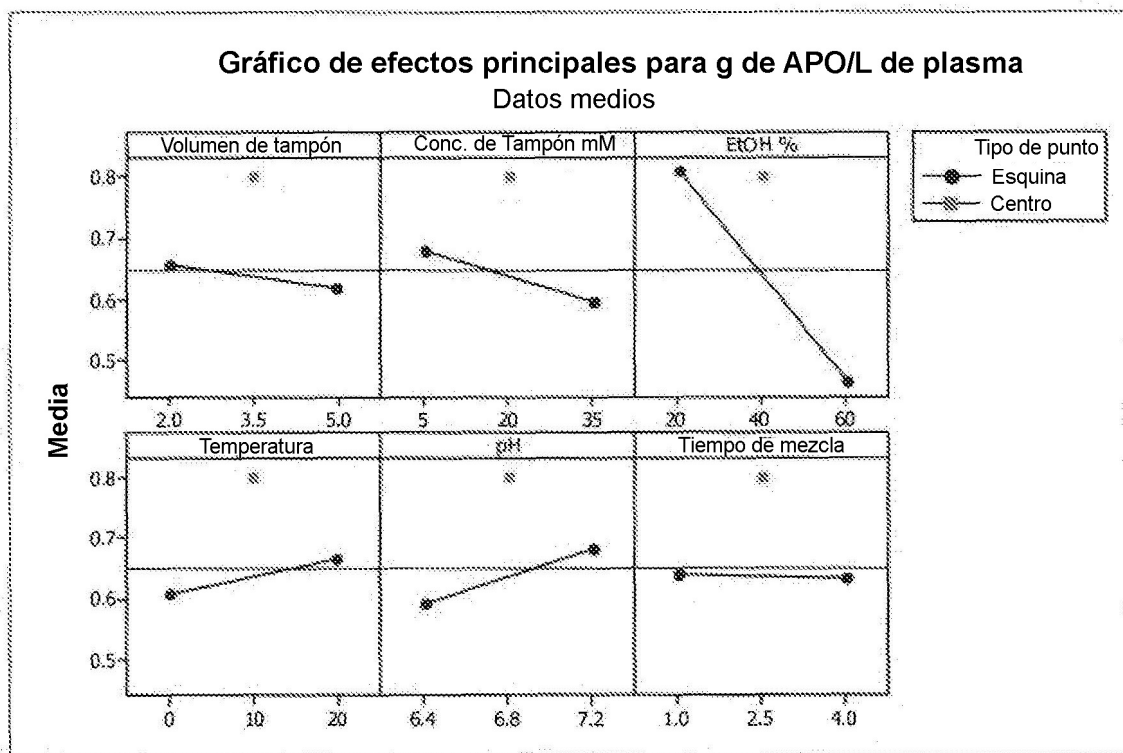


Figura 2

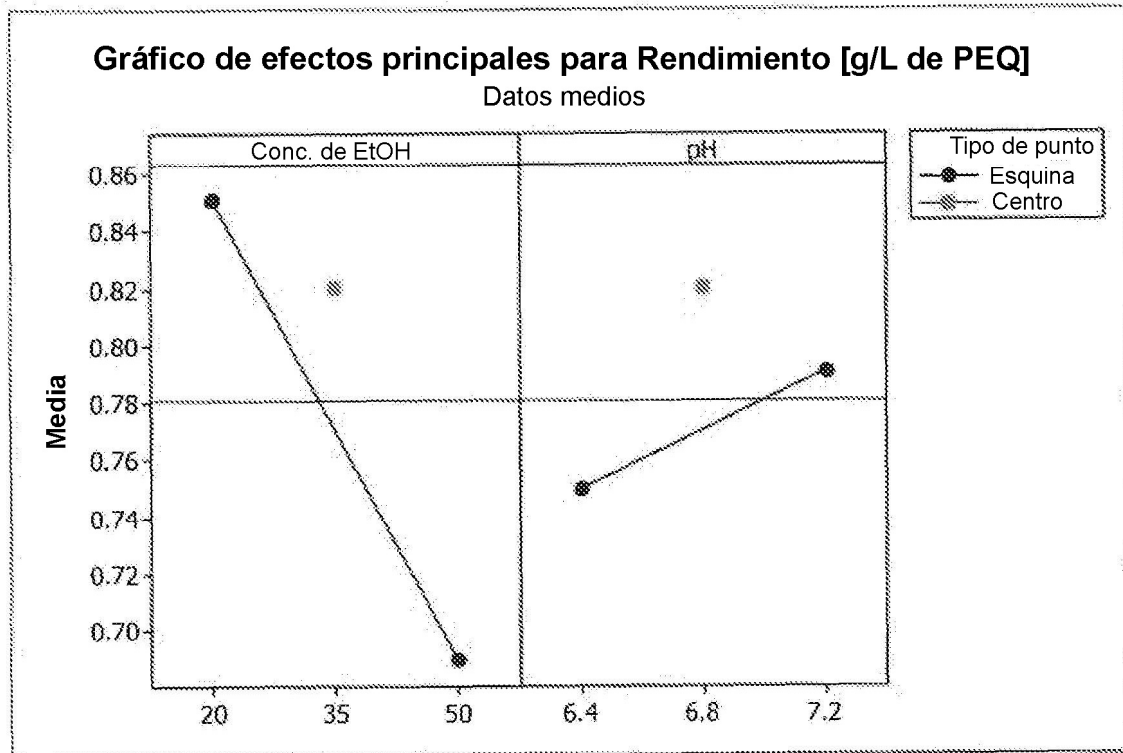


Figura 3

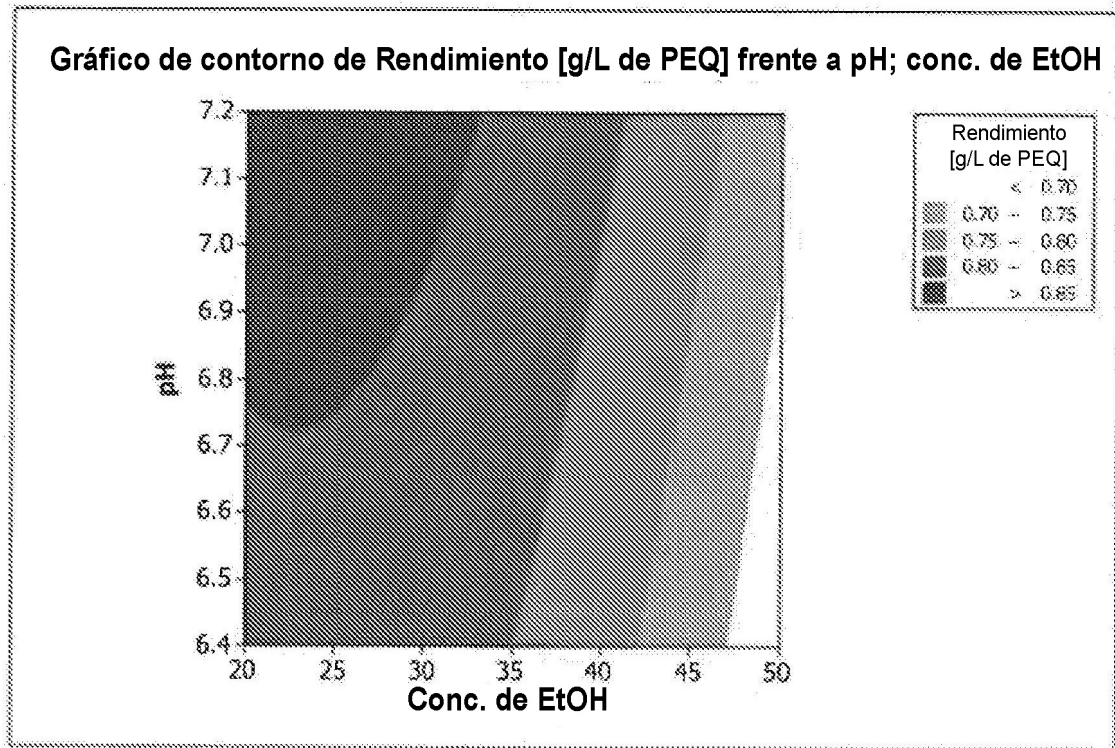


Figura 4

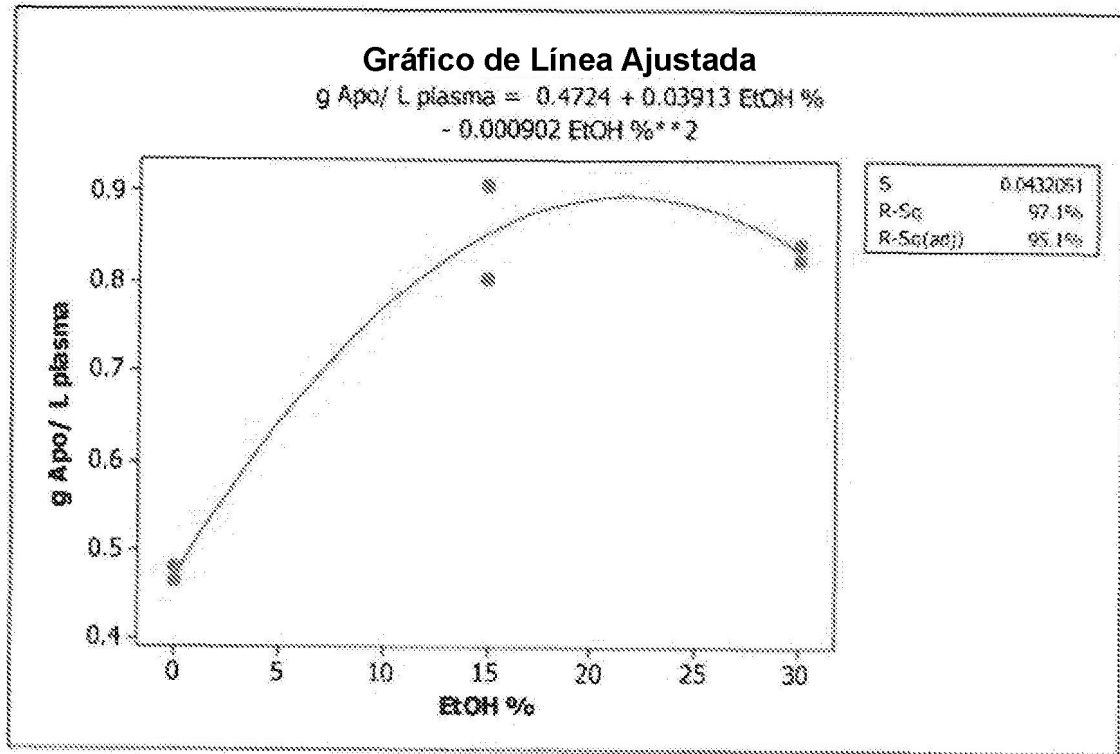
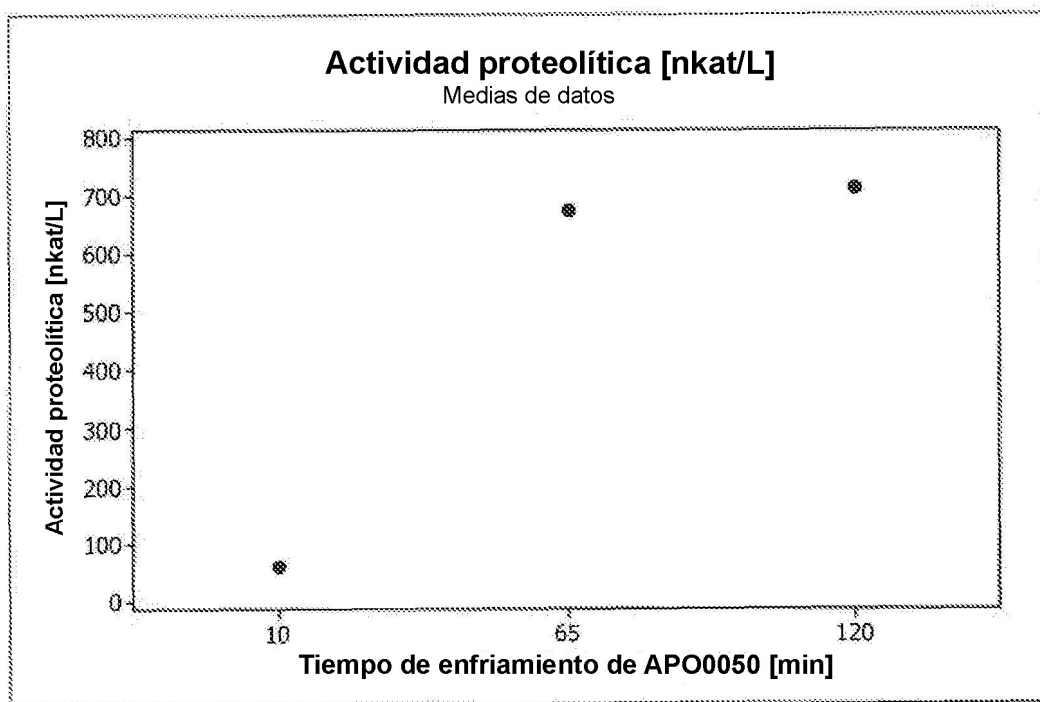


Figura 5

A)



B)

