



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 305 272**

(51) Int. Cl.:

**C07K 14/57** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/08** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02754557 .3**

(86) Fecha de presentación : **12.08.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1419177**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **19.05.2004**

(54) Título: **Procedimiento de purificación a gran escala de Globulina Gc, producto obtenido por el mismo y su uso en medicina.**

(30) Prioridad: **14.08.2001 DK 2001 01217**

(73) Titular/es: **Statens Serum Institut  
Artillerivej 5  
DK-2300 Copenhagen S, DK**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.11.2008**

(72) Inventor/es: **Jorgensen, Charlotte Svaerke;  
Laursen, Inga y  
Houen, Gunnar**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.11.2008**

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de purificación a gran escala de globulina Gc, producto obtenido por el mismo y su uso en medicina.

5 **Campo de la invención**

La presente invención presenta un procedimiento a gran escala para purificar Globulina Gc que comprende tres o menos etapas cromatográficas sobre matrices de cambio de iones y una o más etapas validadas de reducción de virus. El uso de globulina Gc para preparar una medicina y en diagramas.

10 **Introducción**

La globulina Gc (también denominada proteína de unión a vitamina D) es una proteína plasmática con una concentración en plasma humano de aproximadamente 300-350 mg/l (Haddad, 1995).

15 La síntesis diaria de globulina GTc se ha determinado que es de 10 mg/kilo de peso corporal y el pool cambiante de globulina Gc se ha estimado que es de 2,9 g (80 kg de peso corporal) (Kawakami *et al.*, 1981). Esto proporciona una semivida estimada para la globulina Gc de aproximadamente 2 día. La globulina Gc tiene una masa molecular de aproximadamente 51 kDa y se ha determinado la estructura completa de globulina Gc (Cooke y David, 1985).

20 La globulina Gc es una proteína de unión a actina (Baelen *et al.*, 1980) y es una parte del sistema limpiador de actina plasmática (Lee y Galbraith, 1992). El sistema limpiador de actina plasmática consiste en gelsolina, que disocia la actina f polimérica de subunidades monoméricas de actina G y globulina Gc que secuestra la actina G y la elimina de la circulación.

25 La actina es una proteína citoesquelética, que se puede liberar en la circulación al producirse daño celular en afecciones como intoxicaciones (por ejemplo, hepáticas), inflamaciones (por ejemplo choque séptico), y lesión de tejidos físicos (por ejemplo lesiones de tráfico). Se ha demostrado que la infusión de actina causa la formación de trombos en las ratas, un efecto que podría prevenirse por preincubación de actina con globulina Gc (Haddad *et al.*, 1990). En ausencia de suficiente globulina Gc la coagulación inducida por actina puede conducir a posteriores complicaciones circulatorias y fallo multiorgánico.

30 Se ha mostrado que en las ratas la actina inyectada forma complejos con globulina Gc y que se elimina principalmente por el hígado con los complejos de actina-globulina Gc que se elimina más rápidamente que la propia actina (Harper *et al.*, 1987, Dueland *et al.*, 1991).

35 Se ha mostrado que los niveles de plasma de globulina Gc se reducen en pacientes con cirrosis hepática (Barra-gry *et al.*, 1978, Walsh y Hadad, 1982, Bouillon *et al.*, 1984, Masuda *et al.*, 1989) necrosis hepática (Lee *et al.*, 1985, Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1988), intoxicación hepática por acetaminofeno hepática (paracetamol) (Lee *et al.*, 1995, Schiod *et al.*, 1995), y choque séptico (Lee *et al.*, 1989). Los niveles reducidos de globulina Gc y los niveles aumentados de los complejos de globulina Gc-actina se pueden correlacionar con el índice de supervivencia en pacientes con fallo hepático fulminante (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1988, Lee *et al.*, 1996, 1997, Wians *et al.*, 1997) trauma múltiple (Dahl *et al.*, 1998), y choque séptico (Lee *et al.*, 1989). En un modelo de hámster de necrosis hepático fulminante inducida por acetaminofeno el nivel reducido de globulina Gc y el nivel aumentado de complejos de actina-globulina Gc se correlacionaron con la gravedad de la enfermedad (Lee *et al.*, 1987, Young *et al.*, 1987). Se han hecho observaciones similares en ratas con choque séptico inducido experimentalmente (Watt *et al.*, 1989).

45 La globulina Gc no se ha usado previamente en medicina, pero Yamamoto (1994) ha mostrado que un derivado la globulina Gc tratada con  $\beta$ -galactosidasa y sialidasa, genera un potente factor de activación de macrófagos y en Yamamoto (1996) se describe una globulina Gc recombinante que se convierte en este factor de activación de macrófagos.

50 La purificación de globulina Gc a partir de plasma o suero humano la han descrito previamente Cleve *et al.*, (1963), Heide y Haupt (1964), Roelcke y Helmbold (1967), Bouillon *et al.*, (1976), Haddad y Walgate (1976), Svasti y Bowman (1978), Chapuis-Cellier *et al.*, (1982), Haddad *et al.*, (1984), Torres *et al.*, (1985), Link *et al.*, (1986), Miribel *et al.*, (1986), Taylos *et al.*, (1986) y Swamy *et al.*, (1995). Estas purificaciones lo han sido todas a un nivel analítico y no son apropiadas para producción a gran escala. Por ejemplo Chapuis-Cellier *et al.*, (1982) describió un procedimiento de purificación para un fenotipo de globulina Gc (Gc1-1) por cromatografía de pseudoafinidad de ligando seguida de cromatografía de gel filtración y de intercambio iónico a partir de 80 ml de plasma humano, donde todo el procedimiento no es apropiado para producción a gran escala. Torres *et al.*, (1985) describe un procedimiento de purificación analítica para la globulina Gc a partir de suero de un paciente con soriasis usando una cromatografía de desplazamiento de intercambio iónico en dos etapas seguida por la eliminación del carboximetildextrano y la posterior purificación sobre una columna de hidroxiapatita. Roelcke y Helmbold (1967) describen un procedimiento de purificación analítica para globulina Gc constituido por tres etapas de cromatografía en columna sobre la misma matriz; hidroxiapatita.

65 Se han usado la cromatografía de afinidad sobre vitamina D (Link *et al.*, 1986, Swamy *et al.*, 1995) o las columnas de actina (Haddad *et al.*, 1984), o procedimientos extensos que incluyen múltiples etapas cromatográficas en columna. Por ejemplo, Cleve *et al.*, (1963) usó precipitación de sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico sobre

celulosa TEAE en tampón fosfato a pH de 7,2, electroforesis preparativa de gel de almidón y cromatografía de exclusión de tamaño sobre Sephacel G-100 para obtener 23 mg de globulina Gc a partir de 11 plasmas humanos. Heide y Haupt (1964) usaron múltiples precipitaciones de sulfato de amonio electroforesis de gel de almidón y cromatografía de exclusión de tamaño para purificar la globulina Gc a partir de la fracción IV de plasma humano precipitado en rivanol Bouillon *et al.*, (1976) usó globulina radio marcada con vitamina D radiactiva para poder seguirla durante la purificación y la selección de las fracciones usando cromatografía de DEAE celulosa, precipitación de sulfato de amonio, cromatografía de hidroxipatita, cromatografía de celulosa CM, cromatografía DEAE Sephadex, cromatografía repetida de hidroxipatita, cromatografía de exclusión de tamaño de biogel, y cromatografía de DEAE Sephadex repetida para obtener 5,2 mg de globulina Gc a partir de 400 ml de suero humano. Haddad y Walgate (1976) también usaron la radiomarcación con vitamina D para seguir la globulina Gc durante la purificación de la fracción IV de Cohn. El procedimiento consistió en cromatografía de DEAE celulosa, cromatografía de exclusión de tamaño sobre Sephadex G200, cromatografía de DEAE Sephadex y electroforesis preparativa de gel de poliacrilamida. Svasti y Bowman (1978) también usaron la radiomarcación con vitamina D para seleccionar fracciones para una posterior purificación y emplearon cromatografía de DEAE Sephadex a pH de 8,3, cromatografía de DEAE celulosa a pH de 8,8 y cromatografía de exclusión de tamaño de Sephadex G-100 para obtener cantidades analíticas de globulina Gc. Chapuis-Cellier *et al.*, (1982) usaron cromatografía sobre azul de Affigel, cromatografía de exclusión de tamaño de Sephadex G-100, y cromatografía azul de DEAE-Affigel para obtener pequeñas cantidades de globulina Gc a partir de plasma. Miribl *et al.*, (1986) usaron cromatografía secuencial sobre colorantes inmovilizados de triacina (Cibacron de cibacron 3-GA seguido por azul de DEAE affigel y finalmente verde de Fractogel TSK-AG) para purificar cantidades analíticas de globulina Gc. Taylor *et al.*, (1986) usaron precipitación de sulfato de amonio, cromatografía de sefarsa azul, HPLC de DEAE-Sephacel seguida por HPLC de DEAE 5PW y finalmente HPLC de exclusión de tamaño para purificar cantidades en miligramos de globulina Gc. en este procedimiento también se usó la radiomarcación vitamina D para detectar globulina Gc.

En el documento WO97/28688 se describe la purificación de proteínas intracelulares de unión a vitamina D (IDBP; que son diferentes de la globulina Gc extracelular) que se usan para tratar pacientes con sobre o subproducción de vitamina D u otras hormonas esteroideas. Las IDBP se purifican usando cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de hidroxipatita.

De este modo, existe una necesidad de un procedimiento mejorado de purificación a gran escala para producir globulina Gc y un producto medicinal de globulina Gc. En este paciente se describe un simple procedimiento de purificación preparativa para globulina Gc a partir de la fracción IV de plasma humano precipitado en etanol. El procedimiento proporciona grandes rendimientos y globulina de gran pureza. Además, el procedimiento conduce a una solución de globulina Gc a salvo de virus, que está lista para su uso como producto medicinal para administración intravenosa.

## Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de purificación para producción a gran escala de globulina Gc. La fuente de globulina Gc es preferiblemente una fracción plasmática bruta pero puede ser cualquier solución, suspensión o sobrenadante que contenga globulina Gc, por ejemplo un producto lácteo, calostro o un caldo de fermentación. La globulina Gc puede ser producida o derivada a partir de plasma por un organismo genéticamente modificado. El procedimiento de la invención incluye dos elementos clave: la purificación por una serie de etapas de cromatografía de intercambio iónico, y la realización de al menos dos etapas de reducción viral. La presente invención también presenta el uso de globulina Gc en medicina y en diagramas.

## Descripción detallada de la invención

La globulina Gc se puede purificar a partir de una gran gama de materiales de partida que contienen globulina Gc. en una realización, el material de partida para el procedimiento de la invención es un sobrenadante o una suspensión de células rotas de un cultivo de células bacterianas, fúngicas de levadura o de mamífero que produce globulina Gc, comprendiendo dicho cultivo celular células que codifican la globulina Gc de mamífero (por ejemplo el ser humano). El cultivo celular que expresa globulina Gc se cultiva en un medio que proporciona al cultivo celular nutrientes necesarios con o sin suero añadido al medio de cultivo. En otra realización, la globulina Gc se purifica a partir de leche y/o calostro de una globulina Gc humana de expresión de mamífero. En una realización, el mamífero es un animal no humano transgénico.

En una realización preferida de la invención, el material de partida para el procedimiento de la invención es plasma bruto, una fracción plasmática cromatográficamente purificada, una fracción plasmática obtenida por precipitación de sulfato de amonio, polietilenglicol o ácido caprílico, o una fracción de proteína plasmática bruta obtenible por procedimiento de fraccionamiento de etanol a escala industrial, tales como la fracción I, II, III más IV de Cohn, la fracción II, III más IV de Cohn, o la fracción III más IV de Cohn. En una realización preferida, la fracción de proteína plasmática es la fracción IV de Cohn, donde el coadyuvante de filtración puede o no estar presente dependiendo del procedimiento empleado para el aislamiento de la fracción de Cohn, es decir, por filtración o centrifugación.

Cada uno de los materiales de partida puede requerir unas cuantas etapas de procesamiento para obtener una solución que contiene globulina Gc, que es una mezcla de proteínas, donde la globulina Gc puede constituir menos del 1% de las proteínas totales de los materiales de partida.

La purificación mediante la presente invención da como resultado globulina Gc purificada a un grado muy elevado, es decir más de 100 veces a partir del material de partida. También es aceptable una purificación de 25, 30, 40, 50 o 75 veces. La purificación a un menor grado es especialmente aceptable cuando se usan mezclas de proteínas menos complejas como material de partida. Es decir, si la globulina Gc constituye más del 1% del contenido total de proteína.

La purificación se lleva a cabo haciendo pasar dicha solución de proteína a través de una serie de columnas de intercambio iónico usando condiciones de pH, temperatura y resistencia iónica que garantizan que la globulina Gc o bien se unirá a las columnas, de la cual se puede posteriormente eluir, o se desliga a través de la columna mientras otras proteínas contaminantes son retenidas unidas a la columna, de la cual se puede posteriormente eluir.

Las columnas usadas son matrices de intercambio iónico que tienen o bien propiedades de intercambio aniónico o propiedades de intercambio catiónico. Las matrices de intercambio iónico se pueden seleccionar a partir de una lista de matrices comercialmente disponibles que tienen una o más de las siguientes entidades químicas adjuntas, los grupos dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE), amonio cuaternario (Q), carboximetilo (CM), sulfopropilo (SP), sulfonilo (S). Las matrices comercialmente disponibles están basadas en agarosa, dextrano, acrilamida, sílice, materiales cerámicos, y otros materiales, e incluyen DEAE celulosa, DEAE sefarosa, QAE celulosa, QAE sefarosa, Q sefarosa, S sefarosa, SP sefarosa, Q sefarosa, S sefarosa, SP sefarosa, CM celulosa, CM sefarosa y otros varios.

El número de columnas de intercambio iónico y el orden de estos pueden variar dependiendo del material de partida.

En una realización preferida, la solución de globulina Gc en primer lugar se cromatografía sobre una columna de intercambio aniónico, a continuación una columna de intercambio catiónico, y posteriormente una columna de intercambio aniónico. Preferiblemente, las columnas se limpian antes y después de su uso con 0,5 M de NaOH para garantizar las condiciones asépticas de producción y evitar la contaminación lote a lote.

Después de la aplicación de la solución que contiene globulina Gc a una matriz, se lava la columna. Los tampones usados para lavar no son tampones desnaturizantes que tienen una composición, pH, y fuerza iónica como consecuencia de la eliminación de una proporción de contaminantes de proteína sin elución sustancial de globulina Gc o como consecuencia de la recuperación de globulina Gc no ligada mientras permanece una proporción principal de proteínas contaminantes unidas a la columna.

El pH y la composición de los tampones se eligen a partir del conocimiento del punto isoelectrico y el peso molecular de la globulina Gc y las proteínas contaminantes. Este conocimiento se puede obtener por enfoque isoelectrico, electroforesis capilar, electroforesis de gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) espectrometría de masa, o una combinación de éstas, tales como la electroforesis de gel bidimensional. El tampón puede ser un tampón tris, un tampón fosfato o cualquier otro tampón con una capacidad de tamponamiento apropiada, como lo conocerán los expertos en la técnica.

Las etapas cromatográficas del procedimiento de la presente invención tienen diversas ventajas. Estas comprende, pero no se limita a: simplicidad, robustez, un alto grado de purificación, una gran recuperación/rendimiento, eliminación de virus, concentración por reducción de volumen.

Un elemento clave en el presente procedimiento es la eficacia de al menos dos etapas de reducción viral, que se pueden validar. Cuando se habla de etapas de reducción viral, se ha de entender que una etapa de reducción viral puede bien ser una etapa de eliminación de virus y/o una etapa de inactivación de virus. Se pueden incluir al menos dos etapas de eliminación de virus y/o etapas de inactivación de virus en el presente procedimiento.

El procedimiento preferido para la producción de globulina Gc a partir de una fracción de proteínas plasmáticas que contienen globulina Gc bruta contiene las etapas subrayadas a continuación:

*Etapas A) Preparar una suspensión acuosa a partir de una fracción de proteínas que contienen globulina Gc bruta precipitada en etanol a temperatura y pH sustancialmente no desnaturizantes*

El término "sustancialmente no desnaturizante" implica que la condición a la cual se refiere el término no causa una pérdida sustancial e irreversible de actividad funcional de las moléculas de globulina Gc, por ejemplo pérdida de actividad de unión a actina, como se puede determinar por ejemplo por un ensayo de inmunolectroforesis cruzada, un ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética, un ensayo de unión a fase sólida, o un ensayo de unión a fase en solución. Ventajosamente, la fracción de proteínas plasmáticas se suspenden en agua tamponada con al menos un sistema tampón no desnaturizante a volúmenes de 5 a 10, preferiblemente de 8 a 12, veces el de la fracción de proteínas plasmáticas. El pH de la suspensión que contienen globulina Gc se mantiene dentro de un pH de 4-10, tal como dentro del intervalo 3,0 a 9,0, preferiblemente 7,5 a 8,5, más preferiblemente aproximadamente 8,0, para garantizar la solubilidad óptima de la solución de globulina Gc y para garantizar las condiciones compatibles con las condiciones elegidas para la posterior etapa de intercambio iónico. Se puede usar cualquier tampón apropiado, como lo conocerán los expertos en la técnica, pero el sistema tampón contiene preferiblemente al menos uno de los siguientes tampones y bases: sodio, dihidrógeno fosfatodisodio hidrógeno fosfato, tris(hidroximetil)aminometano, trisclorhidrato, NaOH.

Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden usar otros numerosos tampones. La suspensión que contiene globulina Gc se mantiene preferiblemente a temperatura ambiente fría hasta la primera etapa de intercambio iónico, para prevenir la sustancial desnaturalización de proteínas y para minimizar la actividad de proteasa. La suspensión que contiene globulina Gc y agua así como el sistema tampón añadido tienen preferiblemente la misma temperatura dentro del intervalo de 0-12°C, preferiblemente 2-10°C, más preferiblemente 3-8°C. La suspensión de pasta precipitada en etanol contiene grandes cantidades de material de proteínas agregadas. Opcionalmente, la suspensión que contiene globulina Gc se filtra para eliminar grandes agregados, el coadyuvante de filtración, si estuviese presente, y la pasta no disuelta residual. La filtración se lleva a cabo preferiblemente mediante filtro de profundidad, por ejemplo C150 AF, AF 2000 o AF 100 (Schenk), 30LA, 50LA o 90LKA (Cuno o filtros similares, y filtro Delipid (Cuno) montado en un filtro de prensa y alojamientos de filtro. La eliminación de agregados, el coadyuvante de filtro, si estuviese presente, y material residual de proteínas no disueltas se podría llevar a cabo por centrifugación. Preferiblemente, se usa un centrifugado de corriente paralela (por ejemplo Westfalia). La suspensión filtrada y clarificada contiene globulina Gc como componente menor a una concentración relativamente baja, por ejemplo 0,5-3% de proteína total.

Opcionalmente, la solución clarificada y recuperada que contiene globulina Gc se concentra 4 a 6 veces, lo cual se puede llevar a cabo por un procedimiento de ultrafiltración. Las membranas empleadas para la ultrafiltración tienen ventajosamente un corte de peso nominal entro del intervalo de 10.000 a 50.000 Da. Un tipo de membrana preferida para el presente procedimiento es una membrana de polisulfona con corte de peso nominal de 30.000 Da, obtenida a partir de Sartorius o Millipore. Se pueden emplear otras membranas de ultrafiltración de material y porosidad comparables. La ultrafiltración puede ir seguida ventajosamente por diafiltración para intercambiar el tampón, consiguiente de este modo una ultra/diafiltración. El término "ultra/diafiltración" significa que la concentración y la diálisis por ultrafiltración y diafiltración, respectivamente se lleva a cabo en una sola etapa. Se contempla que la diafiltración y la ultrafiltración se puedan llevar a cabo en dos etapas separadas. Sin embargo, para prevenir la pérdida innecesaria de producto, se prefiere actualmente llevar a cabo la diálisis y la concentración por los procedimientos de diafiltración y ultrafiltración en una etapa. Opcionalmente, la solución que contiene globulina Gc concentrada se filtra en profundidad para eliminar las partículas y agregados grandes formados por el uso de filtros 90 LA y/o 50LA. (Cuno).

#### *Etapas B) Cromatografía de intercambio iónico de la suspensión acuosa de globulina Gc*

La solución que contiene globulina Gc concentrada y opcionalmente filtrada se somete a al menos dos etapas, pero opcionalmente tres etapas de cromatografía de intercambio aniónico y catiónico para eliminar una proporción sustancial de los contaminantes de globulina Gc, por ejemplo albumina, antitripsina y otras proteínas nativas y desnaturalizadas. En una realización preferida, la solución de globulina Gc concentrada y opcionalmente filtrada se aplica a una resina de intercambio aniónico envasada en una columna de dimensiones apropiadas, y la fracción que contiene globulina Gc se eluye a partir de la resina de intercambio aniónico se aplica a una resina de intercambio catiónico envasada en una columna de dimensiones apropiadas, y la fracción de lujo que contiene globulina Gc de la resina de intercambio catiónico se ha de cargar sobre otra resina de intercambio aniónica envasada en una columna apropiada de dimensiones apropiadas.

Cuando se lleva a cabo la primera cromatografía de intercambio iónico en el procedimiento de purificación de globulina Gc, se prefiere que las condiciones de aplicación, por ejemplo el pH y la fuerza iónica, se elijan de tal manera que una porción principal de los contaminantes, aproximadamente el 40% (por ejemplo agregados y proteínas no Gc) en la solución aplicada pase por la columna para no ser absorbidos o solamente ser ligeramente retenidos para ser eliminados en la fracción de flujo y/o lavado, y sustancialmente toda la globulina Gc se une a la resina de intercambio aniónico junto con el resto de los contaminantes de proteínas. Las condiciones preferidas de elución se eligen para dar como resultado la elución de las moléculas de globulina Gc retenidas por la resina con una recuperación casi total (94-100%) y una coelución de una porción menor de los contaminantes de proteínas tal como el 20% unida a la resina de intercambio aniónico.

Las condiciones preferidas elegidas por la eficacia de la posterior etapa de intercambio iónico, por ejemplo cromatografía de intercambio catiónico, dan como resultado la unión de la mayoría de las moléculas de globulina no Gc presentes en la solución cargada en la resina de intercambio iónico, con la recogida de la globulina Gc con recuperación casi total (90-100%) en la fracción de flujo, con globulina Gc que se constituye a partir del 40º al 80º de l contenido total de proteínas. De este modo, se eliminan los contaminantes de proteínas del material aplicado para ser eluidos de la resina de intercambio catiónico durante la posterior limpieza de la columna. Para alcanzar estas condiciones, la fracción que contiene globulina Gc eluida de la resina de intercambio aniónico se somete a un procedimiento de ultra/diafiltración. De este modo, la fracción que contiene globulina Gc se concentra de 3,5 a 5 veces y el tampón se intercambia por eluido para el equilibrio de la columna de intercambio catiónico. Las membranas empleadas para la ultrafiltración tienen ventajosamente un corte de peso nominal dentro del intervalo de 10.000 a 50.000 Da, Un tipo de membrana preferida para el presente procedimiento es una membrana de polisulfona con corte de peso nominal de 30.000 Da, obtenida a partir de Sartorius o Millipore.

#### *Etapas C) Detección de virus*

La inactivación de virus por el tratamiento de disolvente/detergente (S/D) se lleva a cabo preferiblemente sobre la fracción de flujo que contiene globulina Gc recuperada de la resina de intercambio catiónico después de la filtración a través de un filtro de 0,45 m (por ejemplo Sartorius o Pall). Después del tratamiento S/D durante al menos 6 horas la fracción de flujo que contiene globulina Gc se diluye ventajosamente con una cantidad apropiada de tampón

compatible con las condiciones de equilibrio, por ejemplo el pH y la fuerza iónica elegidas para la última etapa de cromatografía, la cromatografía de intercambio aniónico. En una realización preferida, la solución que contiene globulina Gc tratada con S/D y opcionalmente diluida se aplica a una resina de intercambio aniónico envasada en una columna de dimensiones apropiadas para retener globulina Gc sobre la columna y eliminar por completo el detergente y el disolvente. La fracción que contiene globulina Gc que se ha de eluir a partir de la resina de intercambio aniónico con una recuperación elevada (65-85%) es de gran pureza. Es decir, que la globulina Gc constituye entre el 80 y el 90% del contenido total de proteínas.

Aunque la realización preferida en el procedimiento de la presente invención incluye tres etapas de intercambio iónico, ventajosamente una cromatografía de intercambio aniónico seguida de un intercambio catiónico y finalmente otra cromatografía de intercambio aniónico, se contempla que también es posible llevar a cabo las etapas de intercambio iónico en el procedimiento de manera diferente. En lugar de llevar a cabo las etapas de intercambio iónico en columnas envasadas con la resina de elección, las etapas de intercambio iónico se pueden llevar a cabo como absorción de proteína por lotes, añadiendo la resina de elección a la solución que contiene globulina Gc, como lo sabrán los expertos en la técnica de la purificación de proteínas.

Por diversas razones se prefiere llevar a cabo la cromatografía de intercambio aniónico antes de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico. En primer lugar, el tampón para la extracción puede tener la misma composición que el tampón de equilibrado para la etapa de cromatografía aniónica, lo cual significa que no es necesario el cambio de tampón. En segundo lugar, la pureza de la fracción que contiene globulina Gc obtenida por cromatografía de intercambio aniónico hace que sea posible obtener un aumento pronunciado en pureza utilizando una posterior cromatografía de intercambio catiónico. Dejar que una cromatografía de intercambio aniónico sea la etapa posterior a la cromatografía de intercambio catiónico y la etapa de tratamiento S/D tiene diversas ventajas. En primer lugar, no hay necesidad de una etapa intermedia de un intercambio de tampón. El ajuste de pH y fuerza iónica es suficiente. En segundo lugar, la retención de globulina Gc aplicada a la columna tiene dos ventajas: la eliminación de los productos químicos S/D y una posterior purificación de la globulina Gc por la siguiente elución de la columna. Intercambiar el orden de las etapas de cromatografías conduciría a un procedimiento más laborioso comparado con mantener el orden de las etapas de cromatografía iónico propuesto en el procedimiento de la presente invención.

Como lo conocen los expertos en la técnica, los intercambiadores de iones se pueden basar en diversos materiales respecto de la matriz así como de los grupos cargados anexos. Por ejemplo, se pueden usar las siguientes matrices: en las cuales, los materiales mencionados pueden estar más o menos reticulados: basados en agarosa (como Sepharose CL-6B<sup>®</sup>, Sepharose Fast Flow<sup>®</sup> y Sepharose Performance<sup>®</sup>) basados en celulosa (como DEAE Sepharose<sup>®</sup>), basados en dextrano (como Sephadex<sup>®</sup>), basados en sílice y basados en polímeros sintéticos. Para la resina de intercambio aniónico, los grupos cargados que se fijan covalentemente a la matriz pueden ser por ejemplo dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE), y/o amonio cuaternario (Q). Para la resina de intercambio catiónico, los grupos cargados que se fijan covalentemente a la matriz pueden ser, por ejemplo carboximetilo (CM), sulfopropilo (SP) y/o metilsulfonato (S). En una realización preferida del presente procedimiento, la resina de intercambio aniónico empleada es Q Sepharose Fast Flow, pero se puede usar otra resina de intercambio aniónico. Una resina de intercambio aniónico preferida es CM Sepharose Fast Flow, pero se pueden usar otros intercambiadores catiónicos.

El volumen apropiado de resina usado cuando se envasa en una columna de cromatografía de intercambio iónico, reflejado por las dimensiones de la columna, es decir, el diámetro de la columna y la altura de la resina, varía dependiendo por ejemplo de la cantidad de contaminantes de globulina Gc y de proteínas en la solución aplicada y la capacidad de unión de la resina usada.

Antes de llevar a cabo una cromatografía de intercambio iónico, la resina de intercambio iónico se equilibra preferiblemente con un tampón que permite que la resina se una a sus contraiones. Preferiblemente, las resinas de intercambio aniónico se equilibran con un tampón que permite la unión óptima de la globulina Gc cargada sobre la columna. Preferiblemente, la resina de intercambio catiónico se equilibra con un tampón que permite la unión óptima de los contaminantes de proteínas presentes en la solución de globulina Gc aplicada sin retener la globulina Gc.

Si, por ejemplo, la resina de intercambio aniónico elegida para la primera etapa es Q Sepharose FF, entonces la columna se equilibra ventajosamente con un tampón no desnaturalizante neutro a básico que tiene aproximadamente el mismo pH y fuerza iónica que la solución de globulina Gc que se ha de cargar. Cualesquiera de una variedad de tampones son apropiados para el equilibrado de la columna de intercambio iónico, por ejemplo fosfato de sodio o tris(hidroximetil)aminometano. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden usar otros numerosos tampones para el equilibrado siempre que el pH y la conductividad sean aproximadamente iguales que para la solución que contiene globulina Gc aplicada. Un tampón preferido para el equilibrado de la columna de intercambio aniónico es un tampón tris que tiene una concentración tris dentro del intervalo de 5-60 mM, tal como dentro del intervalo de 10-30 mM, preferiblemente aproximadamente entre 20 y 25 mM. Al tampón se le añade ventajosamente una sal, tal como cloruro de sodio en una cantidad que da una concentración dentro del intervalo de 10-60 mM preferiblemente aproximadamente entre 40 y 45 mM. Se prefiere que el pH del tampón tris usado para el equilibrado esté dentro de 1 intervalo de 7,0 a 9,0, tal como dentro del intervalo de 7,5 a 8,0, preferiblemente aproximadamente 8,0. La conductividad está preferiblemente dentro del intervalo de 3 a 8 ms/cm, más preferiblemente aproximadamente 5,3 ms/cm. Los tampones tris se pueden preparar a partir de tris(hidroximetil)aminometano y/o clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano, cloruro de sodio y HCl o NaOH.

## ES 2 305 272 T3

Antes de cargar la solución que contiene globulina Gc clarificada y opcionalmente filtrada sobre la columna de intercambio aniónico, se ajusta preferiblemente la concentración de tampón y el pH de dicha solución, si fuese necesario, a valores sustancialmente equivalentes a la concentración y el pH del tampón de equilibrado empleado.

5 Después de cargar la solución que contiene globulina Gc sobre la columna se prefiere lavar con 5-10 volúmenes de columna tal como 7-8 volúmenes de columna de un tampón de lavado para eliminar los contaminantes de proteínas de la resina con el tampón de lavado que tiene un pH y una fuerza iónica suficientes para eluir una parte principal de los contaminantes de la resina de intercambio aniónico sin causar la elución sustancial de la globulina Gc.

10 El lavado se lleva a cabo ventajosamente usando el tampón de equilibrado, incluso a través de otros tampones, con una concentración similar, y se puede usar el valor de pH para el lavado. Se prefiere usar un tampón tris con NaCl añadido para eliminar los contaminantes de la resina de intercambio aniónico. El pH del tampón podría ser de 7,0 a 9,0, tal como dentro del intervalo de 3,5-8,5, tal como 8,0.

15 La elución de la globulina Gc de la resina de intercambio aniónico se lleva a cabo preferiblemente con un tampón sustancialmente no desnaturizante que tiene un pH y una fuerza iónica suficientes para causar la elución eficiente de la globulina Gc con una coelución mínima de contaminantes de proteínas, recuperando de este modo un eluado que contiene globulina Gc. En este contexto, la elución eficiente significa que al menos el 75%, tal como al menos el 85%, por ejemplo el 95% o más de las proteínas de globulina Gc cargadas sobre la resina de intercambio aniónico se eluyen a partir de la resina. La elución se lleva a cabo ventajosamente como una elución por gradiente de etapa con una concentración constante de cloruro de sodio. En el procedimiento de la presente invención, el tampón preferido usado es Tris que tiene un pH dentro del intervalo de 7,0-9,0, tal como 3,5-8,5, preferiblemente aproximadamente 8,0 y una concentración dentro del intervalo de 5-60 mM, tal como dentro del intervalo de 10-30 mM, preferiblemente aproximadamente 20 mM.

25 Se prefiere que la concentración de sal del tampón de elución sea suficientemente elevada para desplazar la globulina Gc de la resina. Sin embargo, se contempla el uso de una reducción en el pH y una concentración de sal inferior para eluir la globulina Gc de la resina. En una realización preferida del presente procedimiento, la elución se lleva a cabo como una elución por gradiente de etapa con una concentración de sal constante que eluye globulina Gc, por ejemplo concentraciones de cloruro de sodio dentro del intervalo de 60-150 mM, tal como 100-120, preferiblemente aproximadamente 100 mM de cloruro de sodio.

30 La elución se puede llevar a cabo por una elución continua de gradiente de sal. Si se lleva a cabo una elución continua por gradiente de sal, la concentración de sal puede estar ventajosamente dentro del intervalo de 0-150 mM, preferiblemente de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 100 mM de cloruro de sodio. La ventaja de la elución por gradiente de etapa comparada con la elución continua de gradiente de sal es que la elución es más eficaz con una concentración constante de sal y la pureza de la fracción eluida es mayor.

35 Se pueden usar otros diversos sistemas de tampón para eluir la globulina Gc, y el tampón de elución puede comprender, además, un agente de estabilización de proteínas, como lo apreciarán los expertos en la técnica.

40 Después de la elución de la columna de intercambio aniónico, el eluado se desaliniza preferiblemente (es decir dializa) y se concentra ventajosamente. El cambio de tampón y la concentración de globulina Gc se pueden llevar a cabo por un procedimiento combinado de ultra/diafiltración. El término "ultra/diafiltración" significa que la diálisis y la concentración por diafiltración y ultrafiltración, respectivamente, se llevan a cabo en una etapa. Se contempla que la diafiltración y la ultrafiltración se puedan llevar a cabo en dos etapas separadas. Sin embargo, para prevenir la pérdida innecesaria de producto, se prefiere actualmente llevar a cabo la diálisis y la concentración por los procedimientos de diafiltración y ultrafiltración en una etapa.

50 Las membranas empleadas para la dial/ultrafiltración tienen ventajosamente un corte de peso nominal entro del intervalo de 10.000 a 50.000 Da. Un tipo de membrana preferida para el presente procedimiento es una membrana de polisulfona con corte de peso nominal de 30.000 Da, obtenida a partir de Sartorius o Millipore. Se pueden emplear otras membranas de ultrafiltración de material y porosidad comparables.

55 La extensión de concentración puede variar considerablemente. La solución se concentra entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 veces, tal como 3 a 7 veces, preferiblemente aproximadamente 4 veces el volumen de partida, constituyendo preferiblemente un volumen final de aproximadamente 0,5 a 3 veces el de la resina de intercambio catiónico, tal como 1,3 a 1,8 veces el volumen de resina. Un tampón preferido para la diafiltración es de 15-25 mM, tal como 20 mM de fosfato de sodio, pH 5,7. El intercambio de tampón sigue hasta que la conductividad de la solución ultrafiltrada se reduce a un valor inferior a aproximadamente 5-6 ms/cm, preferiblemente aproximadamente 1,5-3 ms/cm. Durante la dial/ultrafiltración, el pH se mantiene preferiblemente dentro del intervalo de 5,0-8,0, preferiblemente 5,4- 6,5, más preferiblemente a aproximadamente 5,7.

60 Después de la dia/ultrafiltración la solución de concentración se puede filtrar a través de un filtro dentro del intervalo de 0,2-1,0 m, preferiblemente aproximadamente 0,45 m, para eliminar los agregados antes de la siguiente etapa.

## ES 2 305 272 T3

El volumen apropiado de resina usada para la columna de cromatografía de intercambio catiónico, se refleja mediante la dimensión de la columna (es decir, el diámetro de la columna y la altura de la resina), y varía dependiendo de por ejemplo la cantidad de proteína en la solución aplicada y la capacidad de unión de la resina usada.

5 Antes de llevar a cabo la cromatografía de intercambio catiónico, la resina de intercambio iónico se equilibra preferiblemente con un tampón que permite que la resina se una a las proteínas que se han de eliminar de la solución aplicada. Si, por ejemplo, la resina de intercambio catiónico elegida es CM Sepharose FF, se equilibra con un tampón ácido no desnaturizante que tiene aproximadamente el mismo pH y la misma fuerza iónica que la solución de globulina Gc a cargar. Cualesquiera de una variedad de tampones son apropiados para el equilibrado de la columna de intercambio iónico, por ejemplo, acetato de sodio, fosfato de sodio o tris(hidroximetil)aminometano. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden usar otros numerosos tampones para el equilibrado siempre que el pH y la conductividad sean aproximadamente iguales que para la solución que contiene globulina Gc aplicada. Un tampón preferido para el equilibrado de la columna de intercambio catiónico es un tampón fosfato de sodio que tiene una concentración de fosfato de sodio dentro del intervalo de 5-30 mM tal como dentro del intervalo de 10-25 mM, 10 preferiblemente aproximadamente 20 mM. Se prefiere que el pH de fosfato de sodio usado para el equilibrado esté dentro del intervalo de 5,3 a 6,5, tal como dentro del intervalo de 5,4-5,9, preferiblemente aproximadamente 5,7. La conductividad está dentro del intervalo de 1 a 3 ms/cm, preferiblemente aproximadamente 1,5 ms/cm. Los tampones fosfato apropiados se pueden preparar a partir de hidrogenofosfato de disodio y/o dihidrogenofosfato de sodio y HCl y/o NaOH. 15

20 Antes de cargar la solución que contiene globulina Gc ultra/diafiltrada y opcionalmente filtrada sobre la columna de intercambio catiónico, la concentración de tampón y el pH de dicha solución se ajustan preferiblemente, si fuese necesario, a valores sustancialmente equivalentes a la concentración y el pH del tampón de equilibrado empleado.

25 Después de cargar la solución que contiene globulina Gc en la columna de intercambio catiónico, la columna se lava ventajosamente con aproximadamente 3 a 6 volúmenes de columna de un tampón de lavado para garantizar que la globulina Gc se elimina cuantitativamente de la columna para ser recogida como una fracción combinada de flujo/lavado que aparece como un pico de proteínas en el cromatograma de la señal UV. La fracción recogida constituye preferiblemente una cantidad equivalente a aproximadamente 2 a 3 volúmenes de columna. Por cuantitativamente se entiende que se recupera preferiblemente aproximadamente entre el 85% y el 90% de la globulina Gc aplicada a la columna, más preferiblemente aproximadamente el 95% o más en la fracción de flujo/lavado que contiene globulina Gc. La mayoría de los contaminantes de proteínas en el material aplicado permanecen ventajosamente unidos a la resina durante estas condiciones preferidas. Lo cual significa que la pureza de la fracción de flujo/lavado que contiene globulina Gc es relativamente alta. Preferiblemente el contenido de globulina Gc está dentro del intervalo de 30 aproximadamente del 40% al 80% del contenido total de proteínas. 35

La eliminación de la globulina Gc de la resina de intercambio catiónico se lleva a cabo ventajosamente usando el tampón de equilibrado, incluso se pueden usar otros tampones sustancialmente no desnaturizantes que tienen un valor de pH y una fuerza iónica suficiente para causar la eliminación eficaz de la globulina Gc de la columna de intercambio catiónico que deja la mayoría de los contaminantes retenidos en la resina para el lavado, recuperando de este modo una fracción que contiene globulina Gc. Se prefiere usar un tampón fosfato para esta eliminación de la globulina Gc de la resina de intercambio catiónico, el pH del tampón podría ser de 5,3 a 6,5, tal como dentro del intervalo de 5,4 a 6,0, tal como 5,7. Se pueden usar otros diversos sistemas apropiados de tampón para eliminar la globulina Gc, como lo apreciarán los expertos en la técnica. 40

45 A continuación de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico se prefiere que la solución que contiene globulina Gc eliminada sea filtrada a través de un filtro dentro del intervalo de 0,2 a 1,0  $\mu\text{m}$ , preferiblemente aproximadamente 0,45  $\mu\text{m}$ , para eliminar los agregados antes de la siguiente etapa.

50 En el procedimiento de producción del producto de globulina Gc, se incorporan al menos dos etapas definidas y validadas de eliminación e inactivación de virus. Estas etapas son un tratamiento S/D como una etapa de inactivación de virus hacia virus envueltos en lípido y una etapa de nanofiltración preferiblemente para eliminar pequeños virus no envueltos. Aparte de los estrictos requisitos respecto de la seguridad de los virus del material plasmático de partida, según las directrices internacionales, y la capacidad bien conocida de reducción viral de un procedimiento de purificación multietapas, la incorporación de dos etapas independientes de reducción viral que son activas tanto contra los virus envueltos como contra los virus no envueltos, el medicamento de la presente invención es sustancialmente seguro contra virus. 55

Los virus infecciosos envueltos en lípido que pueden seguir presentes en la fracción que contiene globulina Gc eliminada de la columna de intercambio catiónico se inactivan preferiblemente en esta etapa del procedimiento por la adición de una cantidad virucida de agente de inactivación de virus a dicha solución que contiene globulina Gc. Una "cantidad virucida" de agente de inactivación de virus se entiende que indica una cantidad que da origen a una solución en la cual las partículas de virus se vuelven sustancialmente no infecciosas y por esto se obtiene una "solución que contiene globulina Gc segura contra virus definida en la técnica. Tal "cantidad virucida" dependerá del agente de inactivación de virus empleado así como de condiciones tales como el tiempo de incubación, el pH, la temperatura, el contenido de lípidos, y la concentración de proteínas. 60 65



El término “agente de inactivación de virus” se entiende que indica tal agente o un procedimiento que se puede usar para inactivar virus envueltos en lípido así como virus no envueltos en lípido. El término “agente de inactivación de virus” se ha de entender como que comprende tanto la combinación de tales agentes y/o procedimientos, sea cual sea el apropiado, así como solamente un tipo de tal agente o procedimiento.

Los agentes preferidos de inactivación de virus son detergentes y/o disolventes, más preferiblemente mezclas de detergentes/disolventes. Se entiende que el agente de inactivación de virus es opcionalmente una mezcla de uno o más detergentes con uno o más disolventes. El tratamiento de disolvente/detergente (S/D) es una etapa ampliamente usada para inactivar virus envuelto en lípido (por ejemplo VIH 1 y VIH2, hepatitis tipo C y noA-B-C, HTLV 1 y 2, la familia de virus del herpes, incluyendo CMV y virus Epstein Barr) en productos sanguíneos. Se pueden usar una amplia variedad de detergentes y disolventes para la inactivación de virus. El detergente se puede seleccionar entre el grupo constituido por detergentes no iónicos e iónicos, y se selecciona por ser sustancialmente no desnaturizante. Preferiblemente, se usa un detergente no iónico ya que facilita la posterior eliminación del detergente de la preparación de globulina Gc por la posterior etapa. Los detergentes apropiados son descritos, por ejemplo por Shanbrom *et al.*, en la patente de los Estados Unidos 4.314.997, y la patente de los Estados Unidos 4.315.919. Los detergentes preferidos son los vendidos bajo las marcas comerciales Triton X-100 y Tween 80. Los disolventes preferidos para su uso en agentes de inactivación de virus son los di- o trialkilfosfatos descritos por ejemplo por Neurath y Horowitz en la patente de los Estados Unidos 4.764.369. Un agente especialmente preferido de inactivación de virus para la puesta en práctica de la presente invención es una mezcla de TNBP y Tween 80, pero, alternativamente, se pueden usar otras combinaciones. La mezcla preferida se añade como un volumen de manera que la concentración de TNBP en la solución que contiene globulina Gc esté dentro del intervalo del 0,2-0,6% en peso, preferiblemente a una concentración de aproximadamente el 0,3% en peso. La concentración de Tween 80 en la solución que contiene globulina Gc está dentro del intervalo del 0,8-1,5% en peso, preferiblemente a una concentración de aproximadamente el 1% en peso.

La etapa de inactivación de virus se lleva a cabo en las condiciones que inactiva los virus envueltos que dan como resultado una solución que contiene globulina Gc sustancialmente segura contra virus. En general, tales condiciones incluyen una temperatura de 4-30°C, tal como 19-28°C, 23-27°C, preferiblemente aproximadamente 25°C y un tiempo de incubación hallado efectivo por estudios de validación. Generalmente, un tiempo de incubación de 1-24 horas es suficiente, preferiblemente 4-12 horas, tal como aproximadamente 6 horas para garantizar la inactivación suficiente de virus. Sin embargo, las condiciones apropiadas (temperatura y tiempos de incubación) dependen del agente de inactivación de virus empleado, el pH y la concentración de proteínas y el contenido de lípidos de la solución.

Después del tratamiento de disolvente/detergente, la solución se diluye ventajosamente con tampón para ajustar el pH y la fuerza iónica. Preferiblemente la concentración y el pH de dicho tampón son de valores suficientes para ajustar la solución a valores sustancialmente equivalente a la concentración, la fuerza iónica y el pH del tampón de equilibrado empleado para la posterior etapa de intercambio iónico.

Después se lleva a cabo la cromatografía de intercambio iónico de inactivación de virus para eliminar el agente de inactivación de virus y los restantes contaminantes de proteínas. Esta etapa se lleva a cabo preferiblemente como ya se ha descrito para la primera etapa de cromatografía de intercambio aniónico en el presente procedimiento, con las excepciones de que el volumen de la resina de intercambio aniónico se puede reducir a aproximadamente el 60% del de la resina de intercambio aniónico usada en primer lugar y que el lavado antes de la elución de la globulina Gc es más extensivo, se usan al menos seis a diez volúmenes de columna de tampón. Adicionalmente, en una realización preferida de la invención el tampón de equilibrado es fosfato de sodio con una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 4-50 mM, preferiblemente 20 mM, y un pH dentro del intervalo de aproximadamente 7,5-8,0, preferiblemente 7,8. El tampón se ajusta con cloruro de sodio preferiblemente a aproximadamente 20-55 mM, preferiblemente 40 mM. La fuerza iónica del tampón de equilibrado es preferiblemente de aproximadamente 4-10 ms/cm, preferiblemente 7 ms/cm. Como se ha mencionado anteriormente, el contenido de fosfato de sodio y cloruro de sodio y el pH de la solución que contiene globulina Gc se ajusta ventajosamente a la misma concentración y mismo pH que el tampón de equilibrado.

El procedimiento preferido de eliminación del agente de inactivación de virus es por cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, se contempla que otros procedimientos, tales como la extracción de aceite y procedimientos cromatográficos alternativos, por ejemplo la interacción hidrofoba, sean útiles. El procedimiento apropiado depende del agente de inactivación de virus empleado. La eliminación de disolvente/detergente se puede, de este modo, llevar a cabo uniendo la globulina Gc a la resina, y posteriormente, una eliminación completa del agente de inactivación con tampón. La cromatografía de intercambio aniónico es un procedimiento utilizable. En el procedimiento de la presente invención, la cromatografía de intercambio aniónico también se lleva a cabo para mejorar la calidad y la pureza global del producto final del procedimiento. En la realización preferida la globulina Gc se eluye a partir de la resina de intercambio aniónico con una recuperación preferiblemente dentro del intervalo del 65-85%. La pureza del eluado que contiene globulina Gc es preferiblemente aproximadamente del 80% al 95% del del contenido total de proteínas, más preferiblemente del 98-99%.

Después de la etapa de cromatografía de intercambio iónico, el eluado que contiene globulina Gc se dializa preferiblemente y se concentra; de este modo el contenido del resto de los componentes menores de proteína también se reduce eficazmente. Ventajosamente, esto se puede llevar a cabo por dia/ultrafiltración como se ha descrito anteriormente. El tampón empleado para la diafiltración es solución salina tamponada de fosfato, PBS, preferiblemente a una concentración de fosfato de sodio de 5 a 25 mM, preferiblemente 10 mM, y cloruro de sodio de aproximadamente 130

## ES 2 305 272 T3

a 160 mM, preferiblemente 150 mM, y a un pH dentro del intervalo de aproximadamente 6,5 a 8,0, preferiblemente aproximadamente entre 7,0 y 7,8 tal como aproximadamente 7,4. Alternativamente, se pueden usar otros tampones fisiológicamente aceptables para la diafiltración como lo conocerán los expertos en la técnica. La diafiltración sigue hasta que la osmolalidad es superior o igual a 200 mOsm/kg.

5

La eficacia de una etapa del procedimiento de eliminación de virus da como resultado la eliminación física de virus, y esto es particularmente útil para la eliminación de virus no envueltos tales como el virus de la hepatitis A o el Parvovirus B19. Estos no se activan generalmente por el tratamiento S/D descrito anteriormente.

10 En una realización preferida, la solución que contiene Gc-globulina se somete a filtración a través de una serie de filtros que permiten que la globulina Gc pase a través de los mismos mientras que retienen las partículas de virus y otras partículas infecciosas (por ejemplo, priones). Este procedimiento se puede llevar a cabo con diferentes filtros que tienen una distribución de dimensión de poros que previene el paso de partículas y virus con una dimensión superior al valor de "corte" nominal. Estos filtros pueden tener un valor de corte de 10, 15, 20, 30, 40, 45, 50, 75, 100 nm u  
15 otro valor apropiado (nanofiltros). Los filtros comercialmente disponibles incluyen filtros Planova (Asahi), filtros DV (Pall) y filtros Viresolve NPF (Millipore).

En una realización preferida, la solución que contiene globulina Gc pasa a través de un filtro de 35 nm (Planova 35N) y a continuación un filtro de 15 nm (Planova 15N) usando un caudal y una temperatura que garantizan la eficacia  
20 óptima de la filtración y una eliminación óptima de las partículas de virus, mientras no se sobrepase la capacidad de carga de proteínas de los filtros. Preferiblemente la presión usada para la filtración se mantiene dentro de 0,1 a 1,0 kg/cm<sup>2</sup> y preferiblemente a 0,5 kg/cm<sup>2</sup> o menos, y la concentración de proteínas en la solución se ajusta para garantizar la filtración y la recuperación óptimas de globulina Gc. El área de filtración a usar depende del volumen total a filtrar como lo conocen los expertos en la técnica.

25

Los filtros se pueden usar por separado o conectados en serie. Opcionalmente, se pueden usar más de uno de cada filtro, bien por separado o conectados en serie, por ejemplo dos filtros de 35 nm y dos filtros de 15 nm, o cualquier otra combinación que da como resultado la eliminación deseada de partículas contaminantes de virus.

30 Se ha de entender que también se pueden usar otros filtros con propiedades de eliminación de virus, tal como filtros de profundidad, por ejemplo Zeta Plus Vr (Cuno), DV50 y DV20 (Pall), Planova 20N (Asahi) u otros filtros con las propiedades deseadas.

Se contempla que se pueden usar también otros procedimientos para eliminar o inactivar virus para producir un  
35 producto de globulina Gc seguro contra virus, tal como la adición de azul de metileno con la posterior inactivación por radiación con luz ultravioleta, como lo conocen los expertos en la técnica.

Si se desea, la solución que contiene globulina Gc purificada, se somete a otros tratamientos tales como la adición de agente de estabilización con el propósito de hacerle apropiado para su formulación como producto líquido a usar,  
40 por ejemplo por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular.

Desde el punto de vista práctico se prefiere que el contenido de la formulación líquida del producto de globulina Gc sea el mismo para su almacenamiento que para su uso. La concentración final de globulina Gc en el producto esta preferiblemente dentro del intervalo del 0,1 al 10% en peso (correspondiente a 1,0-100 g/l) tal como aproximadamente  
45 del 0,5 a 10% en peso, es decir aproximadamente el 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% y 10%.

Se sabe que una elevada concentración de proteínas puede dar como resultado una mayor estabilidad de globulina Gc. Por otra parte, una concentración elevada de globulina Gc significa que el nivel máximo de infusión cuando se administra globulina Gc por vía intravenosa al paciente ha de ser bastante bajo puesto que se han de evitar los efectos  
50 laterales, debidos a la alta presión osmótica del producto.

Actualmente, no hay concentración recomendada para la administración intravenosa de globulina Gc aconsejada por la Farmacopea europea, sin embargo, se espera que el intervalo del 0,5% al 5% (p/v) sea ventajoso. Por otra parte, un producto bastante concentrado (por ejemplo del 7% o más) es ventajoso para inyecciones intramusculares o subcutáneas.  
55

La formulación final preferida del producto de globulina Gc es una solución intermedia entre la estabilidad y las condiciones fisiológicamente aceptables respecto de por ejemplo el pH, la fuerza iónica y la tonicidad.

60 Cuanto más cercano es el valor de pH al valor de pH fisiológico, es decir, 7,1-7,5, preferiblemente 7,2-7,4 mayor es la nivel de infusión que se puede emplear, dependiendo de la concentración de globulina Gc.

Además, el producto de globulina Gc puede comprender agentes de estabilización de proteínas. Además de los alcoholes de azúcar y los sacáridos (tales como sorbitol, manosa, glucosa, trehalosa, maltosa), también se pueden usar proteínas (tales como albumina), aminoácidos (tales como lisina, glicina) y agentes orgánicos (tales como polietilenglicol PEG), ácido caprílico y Tween 80) como estabilizantes. La concentración apropiada del agente estabilizante en la solución que contiene globulina Gc depende del agente específico empleado como se ha descrito anteriormente.  
65

Si fuese necesario la solución de globulina Gc purificada se ajusta para obtener una solución estable e isotónica. El término “solución isotónica” está destinado a indicar que la solución tiene la misma presión osmótica que en el plasma. Se pueden usar mono- o disacáridos para aumentar la osmolalidad de la solución ya que no afecta a la fuerza iónica. Se prefiere llevar a cabo por adición de sacarosa o maltosa hasta una concentración final dentro del intervalo de aproximadamente el 1% al 10% (p/v), preferiblemente el 2% (p/v); alternativamente se puede usar otros sacáridos tales como manosa y glucosa.

Una ventaja del producto obtenible por el procedimiento de la invención es que, cuando se formula como una preparación líquida, el producto está listo para ser usado y estable.

Aunque no se prefiera, es evidente que el producto obtenido por las diversas etapas del procedimiento de la invención también se puede usar por ejemplo como productos liofilizados en lugar de formulaciones líquidas, aunque estos sea menos favorable comparado con el uso de los productos en forma de formulación líquida instantánea.

La presente invención se dirige a la producción de globulina Gc a gran escala. “Gran escala de producción” significa, que cuando una fracción bruta de proteínas plasmáticas es el material de partida, se entiende que el material de partida es preferiblemente un pool plasmático de no más de 1.000 donantes. Alternativamente, “producción a gran escala” puede ser una producción que usa microorganismos genéticamente modificados o mamíferos distintos del ser humano a partir de un gran volumen apropiado de partida.

El producto de globulina Gc se fabrica según GMP, en condiciones asépticas en lugares clasificados. El procedimiento de la invención está de este modo destinado a producir un producto de Gc para su uso en medicina.

El procedimiento de la presente invención se dirige, además, a purificar globulina Gc de un sobrenadante de cultivo celular, a partir de una suspensión de células rotas, un producto lácteo o calostro para el uso posterior del producto de globulina Gc como producto medicinal en seres humanos. De este modo, el procedimiento de fabricación ha de satisfacer los requisitos establecidos en las directivas y líneas maestras de la CEE para productos medicinales tales como los productos biotecnológicos/biológicos o productos derivados de plasma humano, por ejemplo. Obsérvese a título orientativo sobre productos medicinales derivados de plasma, CPMP/BWP/269/95 o directrices similares.

Los requisitos incluyen, pero no se limitan a, el uso restringido de agentes químicos en el procedimiento de purificación así como en el producto final. En el presente procedimiento la globulina Gc se purifica sin la adición de inhibidores de la proteasa, tales como PMSF, o agente bacterioestáticos, tales como azida y metiolato. El producto está de este modo totalmente libre de inhibidores de la proteasa y agentes bacterioestáticos añadidos.

Es de una importancia capital para el efecto clínico del producto de globulina Gc que la actividad funcional de la globulina Gc se mantenga, es decir, el producto está constituido por globulina Gc funcionalmente activa. En este contexto una globulina Gc funcionalmente activa se define como una globulina Gc capaz de unirse a actina.

La actividad funcional de la globulina Gc se puede demostrar *in vitro* por unión de globulina Gc a actina en placas de ELISA revestidas con actina, un ensayo de inmunolectroforesis de Rocket o un ensayo de inmunolectroforesis cruzado donde la globulina Gc se mezcla con actina, o un ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética. En los ensayos electroforéticos la unión de globulina Gc causa un cambio en la movilidad electroforética que se puede usar para medir la actividad de unión.

La actividad funcional se puede demostrar *in vivo* inyectando animales de laboratorio con actina y globulina Gc o provocando la liberación de actina con compuestos como paracetamol y a continuación inyectando globulina Gc para prevenir trastornos circulatorios.

Las principales indicaciones para el producto de globulina Gc son trastornos circulatorios y complicaciones resultantes de la liberación de actina al torrente sanguíneo de manera que pueden producir en un órgano (por ejemplo, hígado, riñón) intoxicaciones con productos medicinales que incluyen paracetamol, en traumas físicos resultantes de heridas, accidentes, quemaduras y otras lesiones, coagulación intravascular diseminada y en afecciones inflamatorias que incluyen síndrome de choque séptico. Se espera que la administración de globulina Gc a dichos pacientes (por ejemplo por vía intravenosa) ayude a aclarar la actina de la circulación previniendo o aliviando de este modo los efectos nocivos de la actina.

Otras indicaciones incluyen déficit de globulina Gc congénita o adquirida y anomalías del metabolismo de vitamina D, así como intoxicación por vitamina D.

La globulina Gc producida por el procedimiento de purificación descrito en el presente documento también se puede usar para producir un producto de globulina Gc desglicosilado para ser usado como coadyuvante o para ser usado para inducir efectos antitumorales por su efecto de activación de macrófagos. A este respecto el producto desglicosilado se puede usar para tratar diversos cánceres, que incluyen cáncer de pecho, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer de piel y otros tipos de cáncer.

## Ejemplos

Se ha de entender que los ejemplos descritos a continuación son ilustrativos de realizaciones del presente procedimiento, y la invención no está destinada a limitarse a los mismos.

### Ejemplo 1

#### *Etapas de procedimientos en la purificación de globulina derivada de plasma a usar como producto medicinal*

Todas las etapas se llevan a cabo a temperatura ambiente salvo la etapa 5 que se realiza a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y las etapas 1 y 2 que se llevan a cabo a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ .

#### Etapas 1

##### *Preparación de pasta de fracción IV de Cohn*

La pasta de fracción IV de Cohn se prepara a partir de plasma humano por procedimiento estándar de fraccionamiento de Cohn (Cohn *et al.*, 1946) esencialmente modificado por Kistler y Nitschmann (1952). La precipitación de etanol se inicia después de que el crioprecipitado se haya eliminado y, si se desea, después de la adsorción de algunas proteínas plasmáticas (tales como Factor IX y Antitrombina) a por ejemplo un material de intercambio iónico y/o una matriz sefarosa de heparina. Las condiciones exactas (pH, concentración de etanol, temperatura, concentración de proteínas) para obtener la pasta de fracción IV aparecen en la figura de la página 266 en Hams JR (ed), Blood Separation and Plasma Fractionation, Wilwy-Liss, Nueva York, 1991. La pasta se aísla en una prensa de filtro añadiendo el coadyuvante de filtración antes de la filtración.

#### Etapas 2

##### *Extracción de globulina Gc a partir de la pasta de fracción IV de Cohn*

A partir de aproximadamente 37,3 kg de pasta de fracción IV que incluye el coadyuvante de filtración (Schenk, Alemania) que corresponde a un volumen de partida de plasma de aproximadamente 375 kg, la extracción se lleva a cabo añadiendo en primer lugar 373 kg de tampón Tris 20 mM que contiene cloruro de sodio 40 mM, pH 8,0, agitando suavemente durante aproximadamente 15 horas. Justo antes de la filtración se añaden 1,7 kg de coadyuvante de filtración (Celite) a la suspensión de fracción IV. La suspensión se filtra a través de una serie de filtros de profundidad con dimensiones de poros decrecientes y un filtro Delipid: placas de filtro C-150-AF (Schenk, Alemania), y cartuchos de 50LA, de 90LA y de filtros Delipid (Cuno, Francia). La solución que contiene globulina Gc filtrada se ultrafiltra opcionalmente sobre un sistema que emplea membranas con un valor de corte de peso nominal de 30 kDa (Sartorius, Alemania), mediante esto la solución se concentra aproximadamente 5 veces.

#### Etapas 3

##### *Cromatografía sobre Q Sepharose (matriz de intercambio aniónico)*

Se envasa una columna con 650 ml de Q Sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech) y se equilibra con tampón tris 20 mM que contiene cloruro de sodio 40 mM, pH 8,0.

Se aplica un volumen de la solución concentrada que contiene globulina Gc de la etapa 2 que contiene una cantidad de globulina Gc de aproximadamente 1.200 mg a la columna. En la siguiente aplicación, la columna se lava con 8 volúmenes de columna de tampón de equilibrado para eliminar contaminantes no ligados de proteínas. Después la globulina Gc se eluye a partir de la columna de intercambio aniónico con 6 volúmenes de columna de tampón tris 20 mM que contiene cloruro de sodio 100 mM, pH 8,0 y se recupera la fracción de globulina Gc eluida.

#### Etapas 4

##### *Cromatografía sobre CM Sepharose (matriz de intercambio catiónico)*

La fracción de globulina Gc eluida de la etapa 3 se concentra 4 veces y se desala por ultra/diafiltración. La membrana empleada es una membrana de polisulfona con un corte de peso nominal de 30 kDa (Sartorius). La diafiltración se lleva a cabo contra un tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 5,7 y sigue hasta que el pH es de 5,7 y la conductividad es de 1,5 ms/cm.

Se envasa una columna con 390 ml de CM Sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech) y se equilibra con fosfato de sodio 20 mM, pH 5,7. Después de la dia/ultrafiltración se aplica la solución que contiene globulina Gc a la columna.

## ES 2 305 272 T3

La globulina Gc pasa a través de la columna sin unirse a la resina CM Sepharose. En la siguiente aplicación la columna se lava con 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado para eliminar toda la globulina de Gc no unida. El flujo y la fracción de lavado que contienen globulina-Gc se recogen como eluado que contiene globulina Gc a partir de la columna de intercambio catiónico.

### Etapa 5

#### *Tratamiento S/D*

El eluado que contiene globulina Gc de la etapa 4 se filtra a través de un filtro combinado de 0,45  $\mu\text{m}$  y 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartoban P Capsule, Sartorius, Alemania) El filtrado se trata a continuación por S/D añadiendo Tween 80 y TNBP a concentraciones finales del 1,0% y del 0,3% en peso, respectivamente. El tratamiento S/D procede durante al menos 6 horas a 25°C.

### Etapa 6

#### *Eliminación de S/D por cromatografía de intercambio aniónico*

Se envasa una columna con 390 ml de Q Sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) y se equilibra con fosfato de sodio 20 mM que contiene NaCl 40 mM, pH 7,8. La solución de globulina Gc tratada con S/D se diluye con un volumen de fosfato de sodio 20 mM que contiene NaCl 48 mM, pH 9,4, 4 veces la de la solución.

La solución diluida de globulina Gc se aplica a la columna de intercambio aniónico, la columna se lava a continuación con 10 volúmenes de columna de tampón de equilibrado, y la globulina Gc se eluye con 7 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM que contiene NaCl 100 mM, pH 7,8 y se recoge.

### Etapa 7

#### *Concentración por ultrafiltración*

La fracción eluida de globulina Gc se filtra a través de un filtro combinado de 0,45  $\mu\text{m}$  y 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartoban 300, Sartorius, Alemania), y se somete a concentración e intercambio de tampón por ultra/diafiltración que emplea una membrana de corte de peso nominal de 30 kDa. En primer lugar una rodaja Sartocom y a continuación un Sistema Sartocon Micro UF (Sartorius, Alemania). La solución concentrada que contiene 10 a 15 mg de globulina gc/ml se diafiltra contra PBS, pH 7,3 y finalmente se filtra a través de un filtro combinado de 0,45  $\mu\text{m}$  y 0,2  $\mu\text{m}$  (Ministart-Plus, Sartorius).

### Etapa 8

#### *Nanofiltración y llenado*

La solución que contiene globulina Gc de la etapa 7 pasa opcionalmente a través de un filtro de 35 nm (Planova 35N, Asahi) y a continuación un filtro de 15 nm (Planova 15N, Asahi) sin sobrepasar la capacidad de carga de proteínas de los filtros. La nanofiltración se lleva a cabo a temperatura ambiente y la presión usada para la filtración se mantiene a 0,5 kg/cm<sup>2</sup> o menos y al menos dentro del intervalo de 0,1-1,0 kg/cm<sup>2</sup>. La preparación de globulina Gc se filtra por filtro estéril (Sartobran 300, Sartorius), y se llena asépticamente como 1 g de globulina Gc por porción en un volumen de no más de 100 ml.

### Ejemplo 2

#### *Etapa validad de reducción viral en el presente procedimiento de purificación de globulina Gc*

#### *Inactivación de virus por la etapa de tratamiento SD*

El tratamiento de la solución de globulina Gc con Tween 80 al 1% + TNBP al 0,3%, a 25°C durante 6 horas se ha validado en un estudio empleando PRV (virus pseudorábicos) como modelo para un virus envuelto robusto. Se obtuvo una reducción viral de más de 6,9 log<sub>10</sub>. El resultado del estudio de validación muestra que la etapa de tratamiento SD inactiva eficazmente los virus envueltos.

## Ejemplo 3

*Método analítico para cuantificar la globulina Gc en el procedimiento*5 *Determinación cuantitativa de globulina Gc por Elisa específico*

Se cuantifica la globulina Gc en un ELISA competitivo específico de globulina Gc. Se recubren placas de microtitulación con globulina Gc purificada, se lavan en tampón de bloqueo (tris 50 mM, pH 7,1, Tween 20 al 1%, NaCl 0,3M) y a continuación se incuban con muestras y anticuerpo antiglobulina Gc monoclonal de ratón. Se detectan los anticuerpos unidos con inmunoglobulinas de cabra conjugados con fosfatasa alcalina contra inmunoglobulinas de ratón. La fosfatasa alcalina convierte el reactivo de color fosfato de paranitrofenilo de una manera dependiente de la concentración. La concentración de las muestras analizadas es estimada por el uso de un estándar de globulina Gc.

15 *Determinación cuantitativa de globulina Gc por inmunoelectroforesis de Rocket*

Las muestras se cargan en pocillos realizados en geles de agarosa al 1%, sumergidas en un tampón tris-ácido barbitúrico-ácido láctico, pH 8,6 y que contiene inmunoglobulinas de conejo contra globulina Gc (dilución 1:40). La electroforesis se lleva a cabo a 2V/cm y los inmunocomplejos se detectan por coloración con Azul brillante de Coomassie. La concentración de globulina Gc en las muestras se determina por comparación con un estándar de globulina Gc.

25 *Determinación de unión a actina por inmunoelectroforesis cruzada*

Las muestras se mezclan con un exceso de actina y se someten a electroforesis en geles de agarosa al 1%, sumergidas en un tampón tris-ácido barbitúrico-ácido láctico, pH 8,6. Se cortan líneas y se someten a una segunda electroforesis de dimensión como se ha descrito anteriormente para la inmunoelectroforesis de Rocket. La movilidad del complejo de globulina Gc-actina es más rápida que la de la globulina Gc. El grado de globulina Gc unida a actina en la muestra se determina midiendo el área del inmunoprecipitado del complejo de globulina Gc-actina y el de la globulina Gc libre y calculando la relación. El resultado de este análisis muestra que la globulina Gc purificada por el presente procedimiento retiene el 100% de la actividad de unión a actina.

## 35 Ejemplo 4

*Rendimiento del procedimiento de purificación*

El volumen de la solución que contiene globulina Gc preparada a partir de 37,3 kg de pasta IV hace un total de aproximadamente 360 kg, con una concentración de aproximadamente 120 mg de globulina Gc por litro. La solución que contiene globulina Gc se concentra aproximadamente 5 veces por ultrafiltración empleando una membrana con un valor de corte de 30 kDa para tener un volumen más fácil de manejar en el posterior procedimiento de purificación. La solución concentrada final que contiene globulina Gc con un volumen medio de 72 kg, contiene aproximadamente 21 g de proteína total y tiene una concentración media de 630 mg de globulina Gc por litro (kg = 1). La recuperación total del procedimiento de extracción da como resultado aproximadamente 45 g de globulina Gc, equivalente a 120 mg por kg de plasma de partida y 1,2 g de globulina Gc por kg de pasta IV.

La solución concentrada que contiene globulina Gc constituye el material para las posteriores etapas de purificación del procedimiento partiendo de una etapa de cromatografía de intercambio aniónico cargando un volumen de la solución que contiene aproximadamente 1.200 mg de globulina Gc (Ejemplo 1). El rendimiento del procedimiento de purificación es de aproximadamente 835 mg de globulina Gc que corresponde a una recuperación de aproximadamente el 70% de la globulina Gc presente en la solución usada y un factor de purificación de 33 relativo al extracto de partida y 246 relativo al plasma. La pureza de la preparación final es elevada, la globulina Gc constituye aproximadamente el 91% del contenido total de proteína.

## 55 Ejemplo 5

*Preparación de globulina Gc para uso terapéutico para pacientes IgA deficientes (comparativo)*

60 Cuando se usa una fracción IV de Cohn como material de partida para la purificación, la preparación final de globulina Gc puede contener IgA en una cantidad de hasta el 10% del contenido de globulina Gc. Se sabe que el déficit de IgA es bastante común, con una prevalencia de aproximadamente el 1,25 por mil y que la inyección intravenosa de IgA puede dar como resultado graves efectos laterales tales como reacciones anafilácticas. Se puede obtener globulina Gc de pureza muy elevada con solamente cantidades de trazas de IgA, no superiores al 0,1%, llevando a cabo una etapa de cromatografía de exclusión de tamaño después del procedimiento de purificación de la presente invención, incrementando de este modo la seguridad de un producto de globulina Gc para uso terapéutico.

Antes de llevar a cabo la cromatografía de exclusión de tamaño la preparación de globulina Gc eluida a partir de la segunda columna de Q Sepharose se concentra fuertemente por ultrafiltración empleando una membrana con un corte de peso nominal dentro del intervalo de 10.000-50.000 Da. Un tipo preferido de membrana es una membrana de polisulfona con un corte de 30.000 Da, obtenida a partir de Sartorius o Millipore. La preparación concentrada de globulina Gc se carga sobre una columna envasada con una resina de exclusión de tamaño, tal como Superdex 200 Prep Grad (Amersham Pharmacia Biotech) y se equilibra con PBS, pH 7,3. La cromatografía de exclusión de tamaño tiene dos propósitos, una purificación y una etapa de cambio de tampón.

El material cargado puede constituir un volumen igual al 3% del volumen de columna envasada. IgA y globulina Gc se eluyen en forma de picos separados de proteína, y el material que se eluye como el pico de globulina Gc se recoge como la preparación final de globulina Gc de pureza muy elevada.

Los expertos en la técnica de la purificación de proteínas juzgarán que se pueden usar otras resinas que poseen la capacidad de separar IgA de globulina Gc para la cromatografía de exclusión de tamaño. Además, otros tampones fisiológicamente aceptables pueden cambiar el PBS para la cromatografía de exclusión de tamaño.

Esta preparación de globulina Gc esencialmente mermada de IgA se puede filtrar fácilmente a través de un nanofiltro antes de su formulación como un producto final de globulina Gc.

## Ejemplo 6

*Procedimientos de diagnóstico para cuantificar la globulina Gc, tanto la concentración total como la globulina Gc desligada/complejada*

La concentración total de globulina Gc, y la cantidad de globulina Gc libre y unida a actina en muestras sanguíneas de pacientes, se mide usando un ensayo ELISA competitivo de fase sólida e inmunoelectroforesis cruzada, respectivamente. La muestra sanguínea se centrifuga, y se recoge el suero para el análisis. Para la determinación cuantitativa de la concentración total de globulina Gc, se recubren placas de microtitración con globulina Gc humana purificada, se bloquean con tampón (tris 50 mM, pH 7,5, Tween 20 al 1%, NaCl 0,3 M), seguido de la incubación con diluciones de sueros de pacientes y anticuerpo monoclonal contra globulina Gc humana. Los anticuerpos unidos de fase sólida se detectan usando inmunoglobulinas de cabra conjugada con fosfatasa alcalina contra inmunoglobulina de ratón, seguido de revelado de color con paranitrofenil fosfato. La concentración total de globulina Gc en el suero se puede estimar a partir de un estándar de globulina Gc. Para estimar la relación de globulina Gc libre y complejada de actina, se analiza entonces el suero por inmunoelectroforesis cruzada. El suero se somete a una primera electroforesis de dimensión en geles de agarosa al 1%, se sumerge en tampón tris-tricina, pH 8,6. Las líneas se cortan y se someten a una segunda electroforesis de dimensión en geles de agarosa al 1% que contienen inmunoglobulinas de conejo levantadas contra la globulina Gc humana desnaturalizada (con especificidad tanto para globulina Gc nativa como desnaturalizada; dilución 1:100). La electroforesis se lleva a cabo a 2 V/cm durante una noche, y los inmunoprecipitados se detectan por coloración con azul brillante de Comassie. La movilidad de la globulina Gc complejada de actina es más rápida que la globulina Gc libre, que da como resultado dos inmunoprecipitados. El grado de globulina Gc complejada contra libre en suero se determina midiendo el área bajo los dos precipitados. La inmunoelectroforesis cruzada se puede usar bien en combinación con un estándar de globulina Gc para calcular directamente la globulina Gc o el ensayo puede proporcionar valores en porcentajes de globulina libre/unida, que por comparación con la determinación de concentración de fase sólida se puede usar para estimar la concentración de globulina Gc libre/unida.

## Referencias

**Baelen HV, Bouillon R, De Moor P.** Vitamin D-binding protein (Gc-globulin) binds actin. *J. Biol. Chem.* 1980; 255:2270-2.

**Barragry JM, Corless D, Auton J, Carter ND, Long RG, Maxwell JD, Switala S.** Plasma vitamin D-binding globulin in vitamin D deficiency, pregnancy and chronic liver disease. *Clin. Chim. Acta.* 1978; 87:359-65.

**Bouillon R, Van Baelen H, Rombauts W, De Moor P.** The purification and characterisation of the human-serum binding protein for the 25-hydroxycholecalciferol (transcalcaferin). Identity with group-specific component. *Eur. J. Biochem.* 1976; 66:285-91.

**Bouillon R, Auwerx J, Dekeyser L, Fevery J, Lissens W, De Moor P.** Serum vitamin D metabolites and their binding protein in patients with liver cirrhosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1984; 59:86-9.

**Chapuis-Cellier C, Gianazza E, Arnaud P.** Interaction of group-specific component (vitamin D-binding protein) with immobilized Cibacron blue F3-GA. *Biochim. Biophys. Acta.* 1982; 709:353-7.

**Cleve H, Prunier JH, Beam AG.** Isolation and characterisation of the two principal inherited group-specific components of human serum. *J. Exp. Med.* 1963; 118:711-26.

- Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, Taylor HL.** Preparation and properties of serum and 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.
- 5 **Cooke NE, David EV.** Serum vitamin D-binding protein is a third member of the albumin and alpha fetoprotein gene family. *J. Clin. Invest.* 1985; 76:2420-4.
- Dahl B, Schiodt FV, Kiaer T, Ott P, Bondesen S, Tygstrup N.** Serum Gc-globulin in the early course of multiple trauma. *Crit. Care. Med.* 1998; 26:285-9.
- 10 **Dueland S, Nenseter MS, Drevo CA.** Uptake and degradation of filamentous actin and vitamin D-binding protein in the rat. *Biochem. J.* 1991; 274:237-41.
- Goldschmidt-Clermont PJ, Lee WM, Galbraith RM.** Proportion of circulating Gc (vitamin D-binding protein) in complexed form: relation to clinical outcome in fulminant hepatic necrosis. *Gastroenterology.* 1988; 94:1454-8.
- 15 **Haddad JG Jr, Walgate J.** 25-Hydroxyvitamin D transport in human plasma. Isolation and partial characterization of calcifidiol-binding protein. *J. Biol. Chem.* 1976; 251:4803-9.
- Haddad JG, Kowalski MA, Sanger JW.** Actin affinity chromatography in the purification of human, avian and other mammalian plasma proteins binding vitamin D and its metabolites (Gc globulins). *Biochem. J.* 1984; 218:805-10.
- 20 **Haddad JG, Harper KD, Guoth M, Pietra GG, Sanger JW.** Angiopathic consequences of saturating the plasma scavenger system for actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87:1381-5.
- 25 **Haddad JG.** Plasma vitamin D-binding protein (Gc-globulin): multiple tasks. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1995; 53:579-82.
- Harper KD, McLeod JF, Kowalski MA, Haddad JG.** Vitamin D binding protein sequesters monomeric actin in the circulation of the rat. *J. Clin. Invest.* 1987; 79: 1365-70.
- 30 **Heide K, Haupt H.** Darstellung noch nicht therapeutisch angewandter Plasmaproteine. Behringwerk Mitteilungen 1964; 43:161-93.
- 35 **Kawakami M, Blum CB, Ramakrishnan R, Dell RB, Goodman DS.** Turnover of the plasma binding protein for vitamin D and its metabolites in normal human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1981; 53:1110-6.
- Kistler P, Nitschmann H.** Large scale production of human plasma fractions. *Vox Sang.* 1962; 7:414-424.
- 40 **Lee WM, Emerson DL, Young WO, Goldschmidt-Clermont PJ, Jollow DJ, Galbraith RM.** Diminished serum Gc (vitamin D-binding protein) levels and increased Gc:G-actin complexes in a hamster model of fulminant hepatic necrosis. *Hepatology.* 1987; 7:825-30.
- 45 **Lee WM, Reines D, Watt GH, Cook JA, Wise WC, Halushka PV, Galbraith RM.** Alterations in Gc levels and complexing in septic shock. *Circ Shock.* 1989; 28:249-55.
- Lee WM, Galbraith RM.** The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *N Engl J Med.* 1992; 326:1335-41.
- 50 **Lee WM, Galbraith RM, Watt GH, Hughes RD, McIntire DD, Hoffman BJ, Williams R.** Predicting survival in fulminant hepatic failure using serum Gc protein concentrations. *Hepatology.* 1995; 21:101-5.
- Link RP, Perlman KL, Pierce EA, Schnoes HK, De-Luca HF.** Purification of human serum vitamin D-binding protein by 25-hydroxyvitamin D3-Sepharose chromatography. *Anal. Biochem.* 1986; 157:262-9.
- 55 **Miribel L, Goldschmidt-Clermont P, Galbraith RM, Arnaud P.** Rapid purification of native group-specific component (vitamin D-binding protein) by differential affinity for immobilized triazine dyes. *J. Chromatogr.* 1986; 363:448-55.
- 60 **Roelcke D, Helmbold W.** Gc-Darstellung mittels hydroxylapatitsäulen-chromatographie, Blut, 1967, 14:331-340.
- Schiodt FV, Bondesen S, Tygstrup N.** Serial measurements of serum Gc-globulin in acetaminophen intoxication. *Eur. J. Gastroenterol Hepatol.* 1995; 7: 635-40.
- 65 **Schiodt FV, Bondesen S, Petersen I, Dalhoff K, Ott P, Tygstrup N.** Admission levels of serum Gc-globulin: predictive value in fulminant hepatic failure. *Hepatology.* 1996; 23:713-8.



## ES 2 305 272 T3

**Schiodt FV, Ott P, Bondesen S, Tygstrup N.** Reduced serum Gc-globulin concentrations in patients with fulminant hepatic failure: association with multiple organ failure. *Crit. Care Med.* 1997; 25:1366-70.

**Svasti J, Bowman BH.** Human group-specific component. Changes in electrophoretic mobility resulting from vitamin D binding and from neuraminidase digestion. *J. Biol. Chem.* 1978; 253:4188-94.

**Swamy N, Roy A, Chang R, Brisson M, Ray R.** Affinity purification of human plasma vitamin D-binding protein. *Protein Expr Purif.* 1995; 6:185-8.

**Taylor GA, Mazhindu HN, Findlay JB, Peacock M.** Purification of vitamin D binding protein from human plasma using high performance liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta.* 1986; 155:31-41.

**Torres AR, Krueger GG, Peterson EA.** Purification of Gc2 globulin from human serum. *Anal. Chem.* 1985, 144:469-476.

**Walsh PG, Haddad JG.** "Rocket" immunoelectrophoresis assay of vitamin D-binding protein (Gc globulin) in human serum. *Clin. Chem.* 1982; 28:1781-3.

**Wians FH, Lin W, Brown LP, Schiodt FV, Lee WM.** Immunonephelometric quantification of group-specific component protein in patients with acute liver failure. *Liver Transpl. Surg.* 1993; 3:28-33.

**Yamamoto, N.** (1994), US5326749.

**Yamamoto, N.** (1996), WO 9640903.

# REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de purificación a gran escala de globulina Gc que comprende las etapas de cromatografía de intercambio iónico y de ultra- y/o diafiltración.
2. Procedimiento de purificación según la reivindicación 1 en el que la etapa de cromatografía comprende tanto la cromatografía de intercambio aniónico como la cromatografía de intercambio catiónico.
- 10 3. Procedimiento de purificación según la reivindicación 2 en el que la etapa de cromatografía comprende
  - i. cromatografía de intercambio aniónico seguida de
  - 15 ii. cromatografía de intercambio catiónico y
  - iii. cromatografía de intercambio aniónico.
4. Procedimiento de purificación según la reivindicación 1 en el que las etapas comprenden
  - 20 a. cromatografía de intercambio aniónico
  - b. ultrafiltración/diafiltración
  - c. cromatografía de intercambio catiónico
  - 25 d. cromatografía de intercambio aniónico.
5. Procedimiento de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que comprende una o más etapas de reducción viral.
- 30 6. Procedimiento de purificación según la reivindicación 5 en el que una etapa de reducción viral consiste bien en añadir una cantidad virucida de una mezcla de al menos un disolvente no desnaturalizante y al menos un disolvente, o la eliminación de virus por filtración.
- 35 7. Procedimiento de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el que las etapas comprenden
  - A. opcionalmente filtración y/o ultrafiltración/diafiltración de la solución que contiene globulina Gc
  - B. cromatografía de intercambio aniónico
  - 40 C. ultrafiltración/diafiltración
  - D. cromatografía de intercambio catiónico
  - 45 E. reducción viral añadiendo una cantidad virucida de una mezcla desnaturalizante de al menos un detergente no desnaturalizante y al menos un disolvente
  - F. cromatografía de intercambio aniónico
  - 50 G. ultrafiltración/diafiltración
  - H. reducción viral por nanofiltración
8. Procedimiento de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en el que las etapas comprenden
  - 55 A. opcionalmente filtración y/o ultrafiltración/diafiltración de la solución que contiene globulina Gc
  - B. cromatografía de intercambio aniónico
  - 60 C. ultrafiltración/diafiltración
  - D. cromatografía de intercambio catiónico
  - 65 E. reducción viral añadiendo una cantidad virucida de una mezcla desnaturalizante de al menos un detergente no desnaturalizante y al menos un disolvente
  - F. cromatografía de intercambio aniónico

## ES 2 305 272 T3

G. ultrafiltración

H. cromatografía por exclusión de tamaño

5 I. reducción viral por nanofiltración.

9. Procedimiento de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en el cual el material de partida es un sobrenadante, una suspensión, una fracción bruta de proteínas plasmáticas, un producto lácteo, calostro que contienen globulina Gc o un material recombinante que contiene globulina Gc.

10 10. Procedimiento de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el cual el material de partida es una fracción bruta de proteínas plasmáticas.

15 11. Procedimiento de purificación según la reivindicación 10, en el cual la fracción bruta de proteínas plasmáticas es una fracción IV de Cohn o una combinación de fracciones I, II, III y IV.

12. Procedimiento de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 seguido de una etapa de deglicosilación de la globulina Gc purificada.

20 13. Uso de una preparación que comprende globulina Gc purificada obtenida por el procedimiento de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12 para la fabricación de un medicamento para su uso contra la intoxicación con productos medicinales, por ejemplo el paracetamol.

25 14. Procedimiento de diagnóstico que determina la cantidad de globulina Gc libre y la cantidad de globulina Gc unida a actina a partir de una muestra sanguínea por inmunoelectroforesis cruzada.

30

35

40

45

50

55

60

65