

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 919 861**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2013 PCT/EP2013/054698**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13132053**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2013 E 13708164 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2022 EP 2822965**

54 Título: **Procedimiento de enriquecimiento de IgA**

30 Prioridad:

09.03.2012 EP 12158927

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

28.07.2022

73 Titular/es:

**CSL BEHRING AG (100.0%)
Wankdorfstrasse 10
3014 Bern, CH**

72 Inventor/es:

**EL MENYAWI, IBRAHIM;
LOETSCHER, MARIUS y
SIEGEMUND, DOREEN**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 919 861 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de enriquecimiento de IgA

La invención se refiere a un procedimiento para enriquecer IgA (e IgM) a partir de material que comprende IgA. En particular, se refiere a un procedimiento de elución secuencial de un intercambiador aniónico que conduce a un enriquecimiento y separación ventajosos de la IgA monomérica y dimérica.

Introducción

Como es bien sabido, las inmunoglobulinas juegan un papel importante en el sistema inmune de los mamíferos a la hora de combatir infecciones. Las inmunoglobulinas (Ig) son proteínas inmunes específicas sintetizadas por los linfocitos B, que se encuentran en el plasma sanguíneo, la linfa y otras secreciones corporales de todos los vertebrados. Las inmunoglobulinas constituyen aproximadamente 20% de las proteínas del plasma en los humanos.

Todas las inmunoglobulinas, independientemente de su especificidad, tienen una estructura común con cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (H) idénticas, cada una de ellas con grupos de oligosacáridos unidos covalentemente, y dos cadenas ligeras (L) idénticas, normalmente no glicosiladas; las cadenas están unidas covalentemente por enlaces disulfuro. Las cuatro cadenas polipeptídicas contienen regiones constantes (C) y variables (V), que se encuentran en los terminales carboxilo y amino, respectivamente. Las cadenas pesadas y ligeras tienen una única región V, mientras que las ligeras poseen una única región C y las pesadas contienen tres regiones C. Las regiones V de las cadenas pesadas y ligeras se combinan para formar dos sitios de unión al antígeno idénticos (las partes del anticuerpo que se unen al antígeno). Los determinantes estructurales de la región Fc de la inmunoglobulina median funciones efectoras como el transporte placentario o la toxicidad celular dependiente del antígeno.

Las inmunoglobulinas se dividen, en función de los componentes de su cadena H, en cinco clases principales con propiedades bioquímicas y fisiológicas diferentes: IgG (cadena pesada γ), IgA (α), IgM (μ), IgD (δ) e IgE (ϵ). Hay dos tipos de cadena ligera, κ y λ . Las moléculas individuales pueden contener cadenas κ o λ , pero nunca ambas. En el hombre, la proporción de inmunoglobulinas que contienen cadenas ligeras κ o λ es de aproximadamente 60:40.

Debido a la disponibilidad y a la gama de aplicaciones, tres clases de inmunoglobulinas, IgG, IgA e IgM, son más importantes que las demás. La IgG humana representa la inmunoglobulina más abundante en plasma, mientras la IgA representa la principal clase de anticuerpo en secreciones externas tales como saliva, lágrimas y moco de los tractos respiratorio e intestinal. La IgA constituye una de las primeras líneas de defensa contra los patógenos bacterianos y virales. La IgM es, por mucho, el anticuerpo más grande físicamente en el sistema circulatorio humano, aparece al principio del curso de una infección y suele reaparecer, en menor medida, tras una nueva exposición.

La forma monomérica pura de la IgA consiste en dos cadenas ligeras (L) y dos pesadas (H); en la forma dimérica verdadera, dos de estos monómeros están acoplados por una cadena llamada J (cadena de unión). En el plasma, los monómeros de IgA existen en equilibrio con los dímeros de IgA no asociados covalentemente; sin embargo, los dímeros de IgA que contienen cadenas J también están presentes. La IgA dimérica total (es decir, los dímeros verdaderos que contienen cadena J y los dímeros de IgA no asociados covalentemente) constituye aproximadamente el 10-25 % de la IgA total. En las secreciones de las membranas mucosas y las glándulas, predominan los dímeros de IgA que contienen la cadena J con un componente secretor adicional (SC). Existen dos subclases de IgA, la IgA1 y la IgA2, que normalmente están presentes en el suero humano en una proporción relativa del 80-90% al 10-20% en peso. Esta relación puede alterarse durante el aislamiento de la IgA. La relación natural entre las cadenas ligeras κ y λ en un preparado de inmunoglobulina es de aproximadamente 1:1. La IgA sólo representa aproximadamente el 3-4% de la proteína total del suero humano normal.

La IgM forma polímeros en los que múltiples monómeros están unidos covalentemente con enlaces disulfuro, principalmente como un pentámero pero también como un hexámero. La cadena J se encuentra en la IgM pentamérica pero no en la forma hexamérica, quizás debido a las limitaciones de espacio en el complejo hexamérico. La IgM pentamérica también puede producirse en ausencia de la cadena J. En la actualidad, todavía no se sabe con certeza qué fracción del pentámero normal contiene la cadena J, y en esta medida tampoco se sabe si un pentámero que contiene la cadena J contiene una o más cadenas J (Erik J. Wiersma et al. (1998) J. Immunol. 160: 5979-5989). Debido a que la IgM es una molécula grande, no puede difundirse bien y sólo se encuentra en el intersticio en cantidades muy bajas. La IgM se encuentra principalmente en el suero, pero debido a la presencia de la cadena J, también es importante como inmunoglobulina secretora. Debido a su naturaleza polimérica, la IgM posee una gran avidéz y es especialmente eficaz para la activación del complemento.

Durante el último siglo, se usaron exitosamente preparaciones de IgG del plasma humano, para la profilaxis y tratamiento de diferentes enfermedades infecciosas. Tradicionalmente, estas preparaciones de inmunoglobulina se desarrollaron para la administración sistémica y estaban compuestas en gran parte por IgG. Sin embargo, el uso exitoso de la leche materna para la profilaxis y el tratamiento de la diarrea infantil puso de manifiesto los beneficios potenciales de la IgA plasmática y de la mucosa (secretora) (Hammarstrom L. et al. (1994) Immunol. Rev. 139: 43-70).

Un ensayo clínico realizado por Eibl et al (Eibl, M. et al. (1988) N Engl J Med 319: 1-7) indica que la alimentación por vía oral con una preparación de inmunoglobulina rica en IgA derivada del plasma (IgA 73% y 26% IgG) puede prevenir el desarrollo de la enterocolitis necrotizante. Otras indicaciones, por ej., las infecciones de las mucosas, también pueden beneficiarse del tratamiento con IgA. Sin embargo, la IgA derivada del plasma ya no está disponible, y actualmente no existe ningún producto de IgA.

Los procedimientos conocidos y comunes para el aislamiento y la purificación de las inmunoglobulinas se basan principalmente en las diferencias de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las moléculas pertenecientes a este grupo, tal como sus masas moleculares, puntos isoeléctricos, solubilidad en diferentes condiciones; además, cabe destacar su afinidad con algunas sustancias (por ejemplo, las proteínas A y G bacterianas). La cromatografía en gel, la cromatografía de afinidad y la cromatografía de intercambio iónico, la diálisis y la precipitación por sales y disolventes orgánicos se basan en diferentes propiedades de las moléculas de inmunoglobulina. Los protocolos más utilizados descritos en la literatura combinan varios enfoques.

Los procedimientos comerciales para el aislamiento de las inmunoglobulinas a partir de las reservas de plasma suelen comenzar con el fraccionamiento en etanol, por ejemplo, como el desarrollado por Cohn (Cohn et al. (1946) J. Am. Chem. Soc. 68:459; Oncley et al. (1949), J. Am. Chem. Soc. 71: 541). Se han descrito numerosas variantes del procedimiento original de Cohn.

Un enfoque alternativo a la precipitación de etanol es descrito por Steinbuch et al. (Rev. Franc. Et. Clin. et Biol. 1969, XIV, 1054). Este enfoque utiliza el ácido octanoico para la precipitación dejando las inmunoglobulinas en el sobrenadante. Las inmunoglobulinas se purifican además por adsorción (en "lotes") utilizando un intercambiador aniónico, la celulosa DEAE.

Ya se ha explorado el uso de procedimientos cromatográficos para la purificación de IgG a partir de fracciones de plasma ricas en inmunoglobulina para productos de IGIV. En particular, la cromatografía de intercambio catiónico y aniónico en etapas separadas o en serie se describen en los procedimientos patentados para la purificación de IgG a partir de plasma o sus fracciones. En la mayoría de los procedimientos, la cromatografía de intercambio aniónico es usada en modo negativo, es decir se usan condiciones para habilitar la unión de las proteínas contaminantes, por ejemplo IgA, IgM, albúmina, fibrinógeno, transferrina, mientras la IgG está en el producto no adsorbido. La IgA y la IgM se pueden eluir de la columna de intercambio aniónico, por ejemplo, aumentando la fuerza de los iones.

Además, se han desarrollado varios procedimientos de separación cromatográfica para aumentar la pureza de los productos. Los que mejor funcionan (en particular documentos EP 0 703 922, WO 99/64462) incluyen al menos dos etapas sucesivas de cromatografía, una de intercambio aniónico y otra de intercambio catiónico. La especificidad de estos procedimientos es proporcionada por la propiedad de los intercambiadores aniónico de no adsorber la IgG, bajo condiciones convencionales de aplicación, pero de unir la mayoría de las otras proteínas copurificadas durante las etapas de prepurificación.

En la patente US 6.307.028 B1 para la purificación de IgG a partir de plasma o sus fracciones, por ejemplo, las fracciones II + III de Cohn, hay dos etapas cromatográficas después del pretratamiento con ácido caprílico. En la primera etapa, se utiliza un intercambiador aniónico fuerte para unir la IgA; en la segunda etapa, se utiliza un intercambiador aniónico débil para unir la IgM. Los inventores reivindican que podrían eluir la IgA y la IgM, respectivamente, con alta salinidad.

Aunque se han descrito numerosos procedimientos de fraccionamiento de IgA en la literatura, sorprendentemente pocos productos de inmunoterapia con IgA han sido comercializados por la industria farmacéutica. Al parecer, la disponibilidad de IgA para uso inmunoterapéutico se ha visto limitada por restricciones técnicas. Los procedimientos de fraccionamiento a gran escala de la IgA no consiguen producir una preparación altamente purificada (es decir, superior al 90%), y los procedimientos de purificación a pequeña escala (por ejemplo, las columnas de afinidad anti-IgA) no pueden proporcionar un producto comercialmente viable. Por consiguiente, son deseables procedimientos para la purificación a gran escala de la IgA, que generan preparaciones de IgA altamente purificadas adecuadas para uso inmunoterapéutico. En particular, la IgA libre de IgG es muy deseable debido a que la IgG puede afectar negativamente a las propiedades antiinflamatorias de la IgA.

La IgA puede fraccionarse a partir del plasma u otro fluido biológico utilizando varias combinaciones de precipitaciones, incluyendo el sulfato de amonio, el etanol, el ácido caprílico, el polietilenglicol y las técnicas cromatográficas. Las resinas de cromatografía utilizadas para aislar la IgA incluyen celulosa DEAE, Sephadex G-200, DEAE-Sephadex A-50, cromatografía de afinidad en inmunosorbentes anti-IgG y anti-IgM, Jacalin-Sepharose, Protein G-Sepharose, Fastflow-S Sepharose, Superose 6, adsorción tiofílica, Sephacryl S-300, anticuerpo anti-IgA conjugado con Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno, cromatografía de afinidad de proteína-A y proteína-G (Cripps, A. W. et al. (1983) J. Immunol. Methods 57: 197-204; Doellgast, D. J. et al. (1976) Immunochemistry. 13: 135-139; Kobayashi, K. et al. (1987) Adv. Exp. Med. Biol. 216B: 1193-1197; Leibl, H. et al. (1995) Protein Expression and Purification 6: 408-410; Pejaudier, L. et al. (1972) Vox. Sang. 23: 165-175; Roque-Barrera, M. et al. (1985) J. Immunol. 134: 1740-1743). Sin embargo, ninguna de estas técnicas ha proporcionado hasta ahora un procedimiento de purificación a gran escala que haga comercialmente viable la purificación de IgA a partir de plasma u otros materiales que comprenden IgA.

El documento WO 97/25352 describe un procedimiento para separar las inmunoglobulinas IgG e IgA en un material de partida que contiene inmunoglobulina, unas de otras y también de sus agregados de alto peso molecular, así como de otras sustancias contaminantes de alto peso molecular que ya estaban presentes en el material de partida o que se formaron durante las etapas de purificación utilizando hidroxilapatita, especialmente hidroxilapatita cerámica y otras etapas de purificación. Si bien el procedimiento descrito en esta solicitud de patente es adecuado para la producción a gran escala de soluciones con contenido de IgA, presenta varias desventajas que hacen deseable el desarrollo de un procedimiento mejorado. Por ejemplo, el material utilizado como material de partida es la Fracción III de Cohn, obtenida a partir de la Fracción II+III, lo que significa que esta fracción no puede utilizarse para la producción de IgG, lo que la hace comercialmente menos atractiva. Además, la solución de IgA resultante requiere varias etapas adicionales de purificación (cromatografía) para lograr una preparación de una pureza aceptable.

Se ha demostrado que la IgA se purifica mediante cromatografía de afinidad de jacalina en Leung Joseph C K et al: "Charge-dependent binding of polymeric IgA1 to human mesangial cells in IgA nephropathy", *Kidney International*, vol. 59, no. 1, 2001, pages 277-285. Tras esta etapa de purificación, se utiliza una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño (mediante FPLC) para separar la IgA monomérica de la polimérica. Finalmente, se realiza una etapa de intercambio aniónico fuerte en MonoQ para separar las fracciones de la cromatografía de exclusión por tamaño por carga. La etapa de cromatografía de intercambio aniónico en Leung et al. no se utiliza para enriquecer la IgA de una composición impura que contiene IgA, ni para separar la IgA monomérica y la IgA polimérica, sino que la IgA monomérica ya purificada y separada y la IgA polimérica se aplican por separado a la etapa de intercambio aniónico para fraccionarlas de forma adicional por carga. Este procedimiento es complicado, ya que requiere varias etapas adicionales (cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño), que son difíciles de llevar a cabo a escala industrial.

Por lo tanto, el solicitante ha desarrollado un nuevo procedimiento cromatográfico para la preparación de inmunoglobulina A y M a partir de una composición que comprende IgA y/o material que contiene inmunoglobulina. Ventajosamente, las fracciones laterales y/o el material de desecho que se obtienen durante el procedimiento de purificación y aislamiento de IgG pueden utilizarse para el aislamiento y la purificación de IgA (e IgM).

El nuevo procedimiento ofrece varias ventajas en comparación con otros procedimientos descritos en la literatura. Este procedimiento se caracteriza por una sencilla elución secuencial y selectiva sin gradientes salinos. El uso de ácidos dicarboxílicos y/o dihidroxi-dicarboxílicos, así como de ácidos hidroxil-tricarboxílicos (o sus sales), tal y como se definen a continuación, bajo condiciones entre débilmente ácidas y ligeramente alcalinas, permite una acción altamente competitiva contra la superficie cargada de la resina de intercambio aniónico. Además, el pH se mantiene constante durante la elución de las respectivas fracciones de pico. Además, el pH de los tampones de elución se mantiene constante.

El procedimiento puede separar las inmunoglobulinas en subfracciones, que pueden servir como material de partida para producir concentrados de IgA e IgM altamente puros. Además, el procedimiento resulta en un enriquecimiento de inmunoglobulinas monoméricas y diméricas/poliméricas en subfracciones separadas. Mediante este procedimiento es posible producir varios concentrados útiles de inmunoglobulinas mediante una única etapa de cromatografía de intercambio iónico, que luego pueden ser procesados para obtener composiciones enriquecidas en IgA monomérica, o IgA dimérica, según se desee. Ventajosamente, el procedimiento descrito proporciona mejoras significativas sobre los actuales procedimientos de purificación del estado de la técnica para la preparación de IgA altamente pura.

40 Sumario de la invención

La invención se refiere, por tanto, a un procedimiento para enriquecer la IgA a partir de una composición que comprende IgA, que comprende las siguientes etapas:

- (a) cargar la composición en un intercambiador aniónico bajo condiciones que permiten la unión de la IgA,
- (b) aplicar una solución de elución alcalina que comprende una sustancia seleccionada del grupo que consiste en ácido tartárico o tartrato, ácido oxálico u oxalato, ácido malónico o malonato, ácido maleico o maleato y ácido cítrico o citrato,

en el que la proteína eluida durante la etapa b) está enriquecida para la IgA monomérica.

Preferentemente, se realiza una etapa de preelución (a1) entre las etapas (a) y (b) aplicando una solución de baja conductividad al intercambiador aniónico. Preferentemente, esta etapa (a1) se realiza a un pH entre débilmente ácido y neutro.

En una realización preferente, el pH de la solución alcalina en la etapa (b) se estabiliza mediante la adición de un componente tampón adicional, preferentemente tampón Tris a pH $7,6 \pm 0,4$, a una concentración final de 1 a 20 mM, preferentemente 2 a 15 mM, más preferentemente 5 a 10 mM.

Preferentemente, el eluido recogido durante la etapa (b) está esencialmente desprovisto de IgM.

El procedimiento descrito anteriormente, puede tener una etapa adicional (opcional) (c), es decir, una etapa de elución adicional llevado a cabo mediante la aplicación de una solución de elución ácida que comprende un competidor fuerte para el intercambiador aniónico, donde el competidor fuerte para el intercambiador aniónico se selecciona entre citrato, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico y sales de sulfatos de hidrógeno o sus mezclas. preferentemente, el competidor fuerte para el intercambiador aniónico es citrato. Preferentemente, la proteína eluida en la etapa c está enriquecida en IgA dimérica.

El intercambiador iónico usado en esta etapa puede ser un intercambiador fuerte iónico o un intercambiador débil iónico. Preferentemente, el intercambiador iónico comprende un ligando de intercambio aniónico, tal como un amonio cuaternario, aminoetil, dietilaminoetil, trimetilaminoetil, o dimetilaminoetil cuaternarios. Más preferentemente, el intercambiador iónico es seleccionado de entre DEAE Sepharose FF, Q-Sepharose (HP y FF), ANX Sepharose FF (con baja y alta sustitución), Capto Q, Capto Q XP, Capto DEAE, Source 30 Q y 15 Q, con máxima preferencia Fractogel TMAE y DMAE.

Preferentemente, la composición que comprende IgA es o se deriva de sangre, suero, plasma u otros fluidos biológicos. Más preferentemente, la composición que comprende IgA es un intermedio o una fracción lateral obtenida durante el fraccionamiento del plasma o la purificación de IgG del plasma.

En un aspecto preferente de la invención, la composición que comprende IgA es un intermedio en un procedimiento de purificación de IgG, y el intercambiador aniónico utilizado en el procedimiento de la invención forma parte del procedimiento de producción de IgG. La IgG se encontrará principalmente en el flujo del intercambiador aniónico, mientras que la IgA se eluye según los procedimientos descritos anteriormente.

En otro aspecto preferente de la invención, la composición que comprende IgA se obtiene por solubilización de un precipitado. Preferentemente, el precipitado es un precipitado de ácido octanoico obtenido durante la purificación de la IgG. El sobrenadante del precipitado de ácido octanoico se procesa normalmente de forma adicional para purificar la IgG. Preferentemente, la etapa de solubilización pone en solución de forma selectiva la IgA y la IgG. Preferentemente, la solubilización se realiza con una solución con una conductividad de entre 0,1 y 1,5 S/m (1 y 15 mS/cm), y un pH de 3,5 a 6 o de 7 a 9,5. Más preferentemente, la solubilización se lleva a cabo con un tampón de fosfato, un tampón de acetato, un tampón de Tris, y/o una combinación de dos o más de estos tampones. Aún más preferentemente, el tampón se selecciona entre el tampón de acetato 0,22M o el tampón de fosfato 0,15M, pH 4,8.

Preferentemente, el tampón y el precipitado intermedio se utilizan en una proporción de entre 1:5 y 1:12.

Otro aspecto de la invención es el uso de la cromatografía de intercambio aniónico para separar la IgA monomérica y dimérica por elución secuencial.

Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal como se define en la reivindicación 1, se refiere a un procedimiento mejorado para preparar una fracción enriquecida en IgA, a partir de una composición que comprende IgA. A partir de la fracción obtenida con el procedimiento de la invención, se puede producir un concentrado de IgA de alta pureza para uso terapéutico. El procedimiento comprende una sola etapa de cromatografía de intercambio aniónico realizada a un pH entre ligeramente ácido y neutro, lo que permite retener la IgA en el soporte cromatográfico, mientras que la mayor parte de la IgG se recoge en el flujo de paso en una forma relativamente pura. Después, la IgA retenida y otros contaminantes se fraccionan utilizando una elución secuencial y selectiva a un pH entre ligeramente ácido y alcalino. El procedimiento de la invención puede utilizarse en un procedimiento cromatográfico para la separación de la IgA monomérica y dimérica.

La composición que comprende IgG puede ser cualquier material, preferentemente es un fluido biológico que contiene IgG. Preferentemente, la composición que comprende IgA es o se deriva de sangre, plasma o suero. La composición que comprende IgA puede ser una solución de una pasta o precipitado, preferentemente la fracción (FI+II+III), (FII+III), o el relleno, de un procedimiento de fraccionamiento en frío con etanol, por ejemplo, como se describe en Cohn / Oncley (Cohn et al. (1946) J. Am. Chem. Soc. 68-459; Oncley et al. (1949), J. Am. Chem. Soc. 71, 541), o el precipitado A, el precipitado B y el precipitado G como se describe en el procedimiento de Kistler and Nitschman (H. Nitschmann et al (1954) Helvetica Chimica Acta 37, 866-73), o sus modificaciones.

La composición que comprende IgA es preferentemente una solución de un precipitado intermedio o una solución intermedia o fracción de desecho obtenida durante la purificación de IgG mediante precipitación con ácido octanoico, polietilenglicol y/o sulfato de amonio a partir de plasma, o cualquier fracción intermedia o de desecho que comprende IgA. Sin embargo, también se pretende incluir en la invención el procedimiento que utiliza otros materiales de partida que contienen IgA. Por ejemplo, la IgG puede ser enriquecida también a partir de otros fluidos biológicos, tal como sobrenadante de cultivo celular, usando el procedimiento de la invención.

Preferentemente, el material de partida es una solución intermedia ya enriquecida con inmunoglobulinas por etapas de procedimiento anteriores, preparada para su aplicación a un intercambiador aniónico durante un procedimiento de purificación de IgG a partir de plasma o fracciones de plasma descrito anteriormente. Preferentemente, la mayor parte de la IgG no se une al intercambiador aniónico y puede procesarse directamente para la purificación de la IgG. El

material unido, que comprende la mayor parte de la IgA contenida en la solución intermedia, puede entonces eluirse de acuerdo con el procedimiento de la invención.

5 Cuando se usa un precipitado como material de partida, la IgG puede ser extraída del precipitado (fracción de procedimiento o fracción lateral) mediante resuspensión del precipitado en un tampón por varias horas. Preferentemente, la IgA y la IgG se solubilizarán selectivamente durante la etapa de resuspensión. Preferentemente, la solubilización es llevada a cabo usando una solución con una conductividad entre 1 y 15 mS/cm, más preferentemente entre 5 y 15 mS/cm. El pH está entre 3,5 y 6, o entre 7 y 9,5. Si se selecciona un pH ácido, éste se sitúa preferentemente entre 4 y 5,5, más preferentemente entre 4,5 y 5,2, y lo más preferentemente aproximadamente a 4,8. Si se selecciona un pH alcalino, está preferentemente entre 7 y 9, más preferentemente entre 7,5 y 8,5. Preferentemente, se utiliza un tampón de fosfato, un tampón de acetato o un tampón de Tris con un pH de aproximadamente 4,8, aunque también se pueden utilizar combinaciones de dos o más de estos tampones. Más preferentemente, la solubilización se lleva a cabo con un tampón de fosfato de 0,1 a 0,2 M, preferentemente 0,15 M, o un tampón de acetato de 0,1 a 0,3 M, preferentemente 0,2 M a pH 4,8. Sin embargo, la persona experta será capaz de identificar amortiguadores más adecuados. La relación de tampón y precipitado es de aproximadamente 1:5 a 1:12, preferentemente 1:5, 1:7, 1:10, o 1:12, pero también pueden usarse otras relaciones. La solubilización se lleva a cabo durante al menos 2 horas, preferentemente durante al menos 4 horas, incluso más preferentemente durante la noche, bajo una fuerte agitación utilizando un mezclador adecuado (por ejemplo, el mezclador Vibro de, por ejemplo, Graber o Viscoprop de, por ejemplo, Ekato).

20 Opcionalmente, se puede llevar a cabo una etapa de clarificación después de la solubilización, por ejemplo, mediante filtración en profundidad.

La primera etapa de acuerdo con el procedimiento de la invención es cargar la composición que comprende IgA en un intercambiador aniónico. El intercambiador aniónico puede proporcionarse como una columna, una membrana, cualquier tipo de matriz, resina u otro material de base, y comprende un ligando de intercambio aniónico. El procedimiento de la invención puede llevarse a cabo en cualquier tipo de intercambiador aniónico, un intercambiador aniónico débil, fuerte o mixto, siempre que se lleve a cabo bajo condiciones que permiten retener la IgA en el intercambiador aniónico durante la fase de carga, mientras que la IgG se recoge en el flujo de paso en una forma relativamente pura.

30 El ligando de intercambio iónico es un grupo que tiene carga positiva. Por ejemplo, un intercambiador aniónico puede comprender grupos tal como amonio cuaternario, aminoetilo cuaternario, dietilaminoetilo, trimetilaminoetilo o dimetilaminoetilo como ligandos. Los ejemplos de intercambiadores aniónicos adecuados son MPHQ, DEAE Sepharose FF, Q Sepharose (HP y FF), ANX Sepharose FF (de baja y alta sustitución), Capto Q, Capto Q XP, Capto DEAE, Capto ANX, Macro Cap Q, Source 30 Q y 15 Q, Q Hyper Cel, Giga Cap Q 650M, QAE 550 C, DEAE Biogel A, Fractogel DEAE, Fractogel TMAE y Fractogel DMAE. Los intercambiadores aniónicos preferentes son MPHQ o Fractogel DEAE MD.

35 La carga se realiza bajo condiciones que permiten que la IgA se una al intercambiador aniónico (etapa (a)). Típicamente, el intercambiador de iones es llevado al equilibrio antes del uso, frecuentemente con un sistema de dos amortiguadores (amortiguadores 1 y 2 de equilibrio), por lo cual el amortiguador 2 de equilibrio es usado antes de la carga. La solución que contiene la IgA suele ajustarse para que tenga un pH y una conductividad similares a los del tampón de equilibrio (tampón de equilibrio 2 cuando se utiliza un sistema de dos tampones). Los tampones de equilibrio son sistemas de tampón comunes adaptados al intercambiador aniónico utilizado. La conductividad del tampón de equilibrio 1 está comprendida entre 5 y 50 mS/cm, más preferentemente entre 5 y 45 mS/cm. El pH está entre 3 y 8. Los ejemplos de tampones adecuados son tampones de fosfato o acetato o una de sus combinaciones. Preferentemente, el tampón es un tampón de acetato, de pH 3 a 5, o un tampón de fosfato, de pH 7 a 8. Las opciones más preferentes para el tampón de equilibrio 1 son el tampón de acetato 0,8 M, pH 3,5 a 4,5 con una conductividad de aproximadamente 8 mS/cm, el tampón de fosfato 0,5 M, pH 7 a 8 con una conductividad de aproximadamente 40 mS/cm o el tampón de fosfato 0,1 M, pH 7 a 8 con una conductividad de aproximadamente 10 mS/cm. La conductividad del tampón de equilibrio 2 está entre 0,5 y 1,5 mS/cm, más preferentemente entre 0,7 y 1,3 mS/cm. El pH está entre 5 y 8,5. Los ejemplos de opciones adecuadas para el tampón de equilibrio 2 son fosfato, acetato y sus combinaciones. Preferentemente, el tampón es un tampón de acetato, de pH 6 a 7 o un tampón de fosfato/acetato, de pH 7-8. Los tampones más preferentes para el tampón de equilibrio 2 son el tampón de acetato de aproximadamente 10 mM, pH 6 a 6,6 con una conductividad de aproximadamente 1 mS/cm, el tampón de fosfato de aproximadamente 7,5 mM y el tampón de acetato de 2,5 mM, pH 6 a 6,6 con una conductividad de aproximadamente 1 mS/cm, o el tampón de fosfato de aproximadamente 5mM y 10 mM de acetato, pH 6 a 6,6 con una conductividad de aproximadamente 1 mS/cm.

55 Después de cargar el intercambiador aniónico, normalmente se lava con el tampón de equilibrio 2 para eliminar cualquier material no unido.

Opcionalmente, se puede realizar una etapa de preelución para eliminar el material unido de manera débil. Esto puede hacerse con un tampón que contiene fosfato, acetato y sus combinaciones. En la presente invención la preelución se realiza preferentemente con una solución de baja conductividad, preferentemente a un pH débilmente ácido o neutro. Más preferentemente, se utiliza un tampón fosfato/acetato, preferentemente a una concentración de aproximadamente 5 a 15 mM de fosfato y 15 a 45 mM de acetato, más preferentemente a aproximadamente 10 mM de fosfato y 30 mM

de acetato. El pH del tampón de preelución es de aproximadamente 6,0 a 6,8, preferentemente se utiliza un pH de 6,0, pero los expertos en la técnica podrán seleccionar otros tampones adecuados. En la presente invención, las fracciones de preelución contienen principalmente IgG, y la preelución se utiliza preferentemente cuando la composición que comprende IgA contiene una cantidad elevada de IgG en comparación con la cantidad de IgA.

5 Después de la etapa opcional de preelución, el tampón se cambia a un primer tampón de elución (etapa (b)). Los inventores han descubierto ventajosamente que el uso de una sustancia como la definida en la reivindicación 1, produce un buen enriquecimiento de IgA, predominantemente IgA monomérica, en el material, típicamente fracciones, recogido durante la primera elución. Preferentemente, el material recogido durante la primera elución está esencialmente desprovisto de IgM. Preferentemente, se utiliza un pH alcalino, por ejemplo, un pH entre 7,2 y 9,0, más
10 preferentemente entre 7,4 y 7,8, más preferentemente un pH de aproximadamente 7,6. Dicha sustancia se selecciona entre el ácido tartárico/tartrato, el ácido oxálico/oxalato, el ácido malónico/malonato, el ácido maleico/maleato o el ácido cítrico/citrato. Preferentemente, el primer tampón de elución contiene la sustancia a una concentración de 5 a 100 mM, más preferentemente de 20 a 80 mM, aún más preferentemente de 25 a 65 mM, más preferentemente de aproximadamente 55 mM. Además, el primer tampón de elución puede contener otras sustancias tampón tal como
15 acetato de sodio. Por ejemplo, la primera solución de elución puede contener de 1 a 20 mM de acetato de sodio, preferentemente de 1 a 10 mM de acetato de sodio, más preferentemente aproximadamente 5 mM de acetato de sodio. Preferentemente, la primera solución de elución puede comprender un componente tampón adicional, a pH 7,6 ± 0,4, preferentemente Tris, a una concentración final de 1 a 20 mM, preferentemente 2 a 15 mM, más preferentemente 5 -10 mM. El experto en la técnica podrá seleccionar otras sustancias tampón adicionales y concentraciones
20 adecuadas de las mismas que sean convenientes para lograr el pH y la conductividad deseados de la primera solución de elución.

Más preferentemente la sustancia de la primera solución de elución es tartrato u oxalato, más preferentemente es tartrato.

25 Preferentemente, el material recogido durante la primera elución está enriquecido en IgA monomérica y esencialmente libre de IgM, es decir, agotado de IgM.

En una realización más preferente de la invención, se lleva a cabo una etapa adicional (c), que es una segunda etapa de elución. El material, típicamente las fracciones, eluidas en la etapa (c) están enriquecidas para la IgA dimérica, incluyendo la IgA que contiene cadena J. Si la IgM está presente en la composición que comprende IgA, es probable que la IgM también se eluya en esta etapa.

30 Si se desea la segunda etapa de elución, el tampón se cambiará entonces al segundo tampón de elución. Preferentemente, el segundo tampón de elución contendrá un competidor fuerte para el intercambiador aniónico, con el fin de reemplazar la proteína unida del intercambiador aniónico. Los ejemplos de tales competidores fuertes son el citrato, el ácido benenosulfónico, el ácido benzoico y las sales de sulfatos de hidrógeno o sus mezclas. El competidor preferente es citrato. Preferentemente, el pH del segundo tampón de elución será de aproximadamente 3,0 a 6,0, más
35 preferentemente de aproximadamente 4,5 a 5,5, y más preferentemente el pH es de 5,0. Preferentemente, la concentración de citrato en el segundo tampón de elución es de 1 a 100 mM, más preferentemente de 1 a 50 mM, incluso más preferentemente de aproximadamente 25 mM. Además, el segundo tampón de elución puede contener otras sustancias tampón tal como fosfato, cuya concentración es preferentemente de 40 a 50 mM. Más preferentemente, el segundo tampón de elución puede contener 50mM de fosfato de sodio y 25mM de citrato a un pH
40 de 5,0.

El material o las fracciones que están enriquecidas en IgA, o que están enriquecidas en IgA monomérica, o en IgA dimérica, según se desee, se agrupan entonces según se desee y opcionalmente se procesan en forma adicional. Por ejemplo, la cromatografía de exclusión por tamaño puede llevarse a cabo para separar, por ejemplo, la IgA dimérica de la IgM y la IgA monomérica, la cromatografía de afinidad podría utilizarse para eliminar la IgG y/o la IgM restantes
45 (por ejemplo, mediante la cromatografía de afinidad de la proteína A, CaptureSelect IgM), y/o una segunda cromatografía de intercambio iónico podría utilizarse para la separación de impurezas (por ejemplo, el intercambiador aniónico, preferentemente monolito de etilendiamina (EDA)). Los expertos en la técnica pueden idear otras etapas para obtener la pureza deseada.

50 Además, las etapas para eliminar cualquier patógeno, como los virus o las proteínas priónicas, se incluirán en cualquier procedimiento comercial. Estas etapas del procedimiento son bien conocidas por los expertos en la técnica y pueden seleccionarse entre procedimientos como la nanofiltración, el tratamiento con disolventes/detergentes, la pasteurización y otros.

La invención también proporciona el uso de una cromatografía de intercambio aniónico para la separación de la IgA monomérica, que se eluye en la primera etapa de elución, de la IgA dimérica, que se eluye en la segunda etapa de elución. Se prevé que lo mismo podría aplicarse, con los ajustes adecuados, en particular a los materiales de partida,
55 a otros isotipos de inmunoglobulina. Es un reto para un procedimiento que pueda llevarse a cabo a escala industrial, proporcionar la separación de inmunoglobulina monomérica y dimérica o polimérica, porque las propiedades de las proteínas que necesitan ser separadas son muy similares y no suelen ser susceptibles de separación por procedimientos que sean adecuados para su uso a escala industrial. El procedimiento de la invención puede

proporcionar una composición obtenible por dicho procedimiento. Dicha composición puede procesarse en forma adicional, por ejemplo, mediante otras etapas de purificación, y/o mediante la formulación. Por ejemplo, se pueden añadir excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables, se puede añadir un estabilizador si se desea, se puede añadir un agente potenciador o reductor de la viscosidad según se desee. La liofilización también es una opción. Se seleccionará una formulación adecuada en función del uso médico deseado del producto.

En una realización preferente de la invención, la IgA se obtiene a partir de fracciones laterales y/o material de desecho que se obtiene durante un procedimiento de purificación de IgG a partir de plasma humano. Normalmente, las muestras de plasma de varios donantes se agrupan y se congelan hasta su uso. Después, el plasma se descongela, se centrifuga y se realiza el fraccionamiento en etanol según Cohn, o Kistler Nitschmann, o variaciones de los mismos en el sobrenadante (plasma crio-pobre). Generalmente, el pH se ajusta a un determinado intervalo y se añade etanol a una determinada concentración, se forma un precipitado durante varias horas de incubación, normalmente a 4°C, el precipitado y la parte soluble se separan y se utilizan para su posterior procesamiento. Esta etapa suele repetirse en la parte soluble con una mayor concentración de etanol, etc., hasta obtener los precipitados y soluciones deseados.

Los precipitados que contienen inmunoglobulina se solubilizan típicamente utilizando un tampón de acetato de 0,1 a 0,3 M, preferentemente de 0,2 M (pH 4,8), con agitación, durante la noche. Después, se lleva a cabo la precipitación con ácido octanoico y el sobrenadante se procesa nuevamente para la purificación de la IgG. El precipitado contiene IgA y puede ser solubilizado y posteriormente procesado de acuerdo con los procedimientos de la invención.

Como se mencionó anteriormente, el sobrenadante se utiliza para purificar de forma adicional la IgG del plasma. Normalmente, se lleva a cabo un cambio de tampón y el material se aplica a una cromatografía de intercambio aniónico. La IgG purificada se recoge en el flujo, y si sólo se desea purificar la IgG, las proteínas unidas al intercambiador aniónico se eliminan durante el procedimiento de limpieza con condiciones duras (por ejemplo, NaCl 1M o NaOH 1M), y se desechan.

Sin embargo, si se desea purificar adicionalmente la IgA, el intercambiador aniónico puede eluirse como se ha descrito anteriormente para obtener eluatos enriquecidos para la IgA monomérica y/o dimérica. Si se desea, también se puede recuperar la IgM. Normalmente, después de las etapas de lavado adecuadas, se lleva a cabo una preelución, utilizando tampón fosfato/acetato, pH 6,0. El material recogido durante la preelución se denomina F3, y contiene principalmente IgG.

Típicamente, se lleva a cabo una primera elución, utilizando un tampón tartrato/acetato, pH 7,3 a 7,8. Durante esta etapa, se eluye el material F4, que está enriquecido en IgA monomérica, pero también contiene IgG. Ventajosamente, no se encuentra ninguna IgM en este material. Como se ha indicado anteriormente, también se pueden utilizar otros tampones dentro de la invención.

Si se desea, se lleva a cabo una segunda etapa de elución, utilizando un tampón citrato/fosfato a un pH de aproximadamente 5. Otros tampones que se pueden utilizar de acuerdo con la invención para esta etapa se desvelan con anterioridad. La segunda elución proporciona el material F5, que contiene IgG, IgA e IgM. En este material se enriquece la IgA dimérica.

Las etapas de inactivación y/o eliminación de patógenos, tal como la nanofiltración, se incorporarán a estos procedimientos en las etapas adecuadas para garantizar la seguridad del material resultante. Se han descrito numerosos procedimientos para la inactivación y eliminación de patógenos, y los expertos en la técnica podrán incorporar estas etapas al procedimiento sin una carga excesiva.

Como se ha mencionado anteriormente, el precipitado de ácido octanoico es también un material de partida adecuado para el procedimiento de la invención. Los inventores han descubierto ventajosamente que la solubilización con una solución de baja conductividad a un pH entre 3,5 y 6 o 7 a 9,5, lleva preferentemente a la IgA y la IgG a la solución. Por ejemplo, el tampón puede ser un tampón de acetato o de fosfato, aunque se pueden utilizar otros tampones.

Una realización preferente de la invención es un procedimiento para la separación de IgA (e IgM) de una composición que contenga IgA y/o material que comprende inmunoglobulina, en el que el procedimiento se caracteriza porque:

- (i) se carga una composición que comprende IgA en una resina macroporosa de intercambio aniónico,
- (ii) la IgA se aísla de la resina de intercambio, tras una desorción/elución selectiva secuencial,
- (iii) la elución secuencial consiste en

A) una etapa de preelución a un pH entre débilmente ácido y natural, que resulta en una fracción de IgG

B) una primera etapa de elución utilizando una solución de elución a pH ligeramente alcalino que comprende una sustancia seleccionada del grupo que consiste en ácido tartárico o tartrato, ácido oxálico u oxalato, ácido malónico o malonato, ácido maleico o maleato, y ácido cítrico o citrato,

dando como resultado una fracción que contiene al menos del 40 al 60% de IgA monomérica y hasta el 60% de IgG. Esta fracción está desprovista de IgM.

- 5 C) una segunda etapa de elución utilizando ácido hidroxiticarboxílico o sus sales, ácido bencenosulfónico, o ácido benzoico y sales de sulfatos de hidrógeno o sus mezclas a pH ácido, dando como resultado una fracción que contiene aproximadamente 45% de IgM; 25% de IgA (predominantemente di/polimérica), 25% de IgG y 5% de contaminantes distintos de las inmunoglobulinas.

El procedimiento puede integrarse opcionalmente en varios procedimientos de fraccionamiento de plasma de manera muy sencilla, y siempre conduce a las mismas composiciones intermedias de IgA.

- 10 A partir de las fracciones resultantes, se pueden producir concentrados de IgA (e IgM) altamente purificados para posibles aplicaciones terapéuticas. La elución secuencial y selectiva ya ha sido evaluada a escala de planta piloto.

Definiciones

- 15 El término "composición que comprende IgA" se refiere a cualquier composición líquida que contenga IgA. En particular, estas composiciones serán fluidos biológicos tal como saliva, lágrimas o mucosidades, cualquier fracción de plasma o fracción lateral/de desecho que pueda obtenerse, por ejemplo, durante el procesamiento del plasma para purificar proteínas plasmáticas como las IgG con fines terapéuticos. El término también incluye composiciones de IgA producidas in vitro, por ejemplo, IgA monoclonal o IgA producida recombinantemente, por ejemplo, IgA secretada por líneas celulares.

- 20 El término "enriquecer" o "enriquecimiento" en el contexto de la presente invención se refiere a un aumento significativo de la cantidad de una proteína diana en relación con el contenido total de proteínas en una composición, por ejemplo, después de una etapa de purificación. Se lograría un enriquecimiento si la pureza de la proteína diana aumentara en al menos un 20%, preferentemente en al menos un 30%, incluso más preferentemente en al menos un 50%, más preferentemente en más de un 75%. El término "puro" se refiere a una composición que comprende esencialmente sólo la proteína diana. En el contexto de la presente invención, una solución sería una solución de IgA pura si contiene más del 90% (p/p) de IgA, preferentemente más del 95% de IgA, más preferentemente más del 98% de IgA.

- 30 El término "cromatografía de intercambio iónico" se refiere a un procedimiento que permite la separación iónico en función de su carga. En la presente invención, se utiliza la cromatografía de intercambio aniónico, mediante la cual las moléculas cargadas negativamente (por ejemplo, las proteínas en una solución a un pH, en la cual presentan dominios cargados negativamente) son retenidas selectivamente por grupos catiónicos (ligandos de intercambio aniónico), que están unidos covalentemente a una matriz sólida. La matriz sólida puede ser cualquier material portador adecuado, y puede tener forma de cuentas, membranas u otra configuración de soporte sólido adecuada. Normalmente, la matriz sólida se presenta en forma de cuentas y se utiliza como columna. Sin embargo, también se incluyen en la presente invención otras formas de realización del intercambio aniónico. Un intercambiador aniónico fuerte está cargado en un amplio intervalo de pH, mientras que la carga de un intercambiador aniónico débil variaría con el pH.

- 35 "Cargar en un intercambiador aniónico" significa poner la solución que va a ser sometida a la cromatografía de intercambio aniónico en contacto con los ligandos de intercambio aniónico en su soporte sólido. Típicamente, en el presente contexto, el término se refiere a la alimentación de la columna durante la etapa de cromatografía. Sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente, la invención no se limita a una configuración de columna para el intercambiador aniónico. Por ejemplo, también podría llevarse a cabo en modo por partidas.

- 40 El término "flow-through" se refiere al material que no es retenido durante la etapa de cromatografía. En el contexto de la presente invención, se trata de la fracción que no está unida o sólo está débilmente unida al intercambiador aniónico. El flow-through de un intercambiador aniónico determinado variará en función del sistema tampón utilizado.

- 45 El término "eluido" se refiere al material que estaba unido al intercambiador aniónico, pero que se libera del intercambiador aniónico tras un cambio de condiciones, es decir, tras aplicar una "solución de elución" al intercambiador aniónico. Normalmente se recoge en fracciones después de aplicar la solución de elución al intercambiador aniónico.

El término "pH neutro" se refiere a un pH de aproximadamente 7. Típicamente, un intervalo de 6,0 a 7,5 se consideraría neutro, preferentemente un intervalo de 6,5 a 7,5, más preferentemente un intervalo de 6,8 a 7,2, lo más preferentemente un intervalo de 6,9 a 7,1.

- 50 El término "débilmente ácido" se refiere a un intervalo de pH de aproximadamente 4,0 a 6,5, preferentemente un intervalo de 5,0 a 6,0, más preferentemente un intervalo de 5,5 a 6,0.

El término "baja conductividad" se refiere a una conductividad inferior a 15 mS/cm, preferentemente inferior a 10 mS/cm.

El término "esencialmente desprovisto de IgM" se refiere a menos del 10% de IgM (p/p), preferentemente menos del 5%, incluso más preferentemente menos del 2%, más preferentemente menos del 1% de IgM de la proteína total presente.

5 El término "fluido biológico" incluye los líquidos que se originan en el interior del cuerpo de los vertebrados, incluidos los fluidos que se excretan o secretan del cuerpo, como la leche, la saliva, las mucosidades, las lágrimas.

El término "plasma" se refiere al componente líquido de la sangre (aproximadamente 55% del volumen total de la sangre). Éste contiene proteínas plasmáticas como la albúmina, inmunoglobulinas (anticuerpos), factores de coagulación, hormonas y otros componentes como la glucosa o los iones minerales.

10 El término "suero" se refiere al plasma desprovisto de fibrinógeno y de factores de coagulación, es decir, la fracción líquida después de la coagulación.

15 El término "fraccionamiento de plasma" se refiere a los procedimientos de separación de las proteínas del plasma. Típicamente se refiere a las etapas iniciales de procesamiento en los procedimientos de purificación a escala industrial de las proteínas plasmáticas que permiten una primera separación de las principales clases de proteínas plasmáticas que luego se someten a otros procedimientos de purificación. Típicamente el fraccionamiento se lleva a cabo por medio de etanol como lo describen Cohn, Oncley o Kistler Nitschmann o sus variantes. Otros procedimientos de fraccionamiento se basan en la precipitación con otros agentes como el ácido octanoico, el polietilenglicol o el sulfato de amonio.

20 El término "precipitado intermedio" se refiere a un precipitado que es el resultado del fraccionamiento del plasma o de otras precipitaciones que pueden llevarse a cabo durante los procedimientos de purificación posteriores de las proteínas del plasma. Éste suele contener una mezcla de diferentes proteínas plasmáticas.

El término "solubilización de un precipitado" se refiere a la adición de líquido, típicamente un tampón, a un precipitado para devolver las proteínas contenidas en el precipitado a la solución para las etapas posteriores de purificación.

El término "fracción lateral/de desecho" se refiere a un producto intermedio del fraccionamiento del plasma o de los procedimientos posteriores que normalmente no se procesan en forma adicional, es decir, se desechan.

25 La invención se ilustrará a continuación con los siguientes ejemplos no limitantes, haciendo referencia a las siguientes figuras y listado de secuencias:

30 Figura 1: Diagrama de flujo del procedimiento de enriquecimiento de IgA en base a diferentes precipitados intermedios del fraccionamiento del plasma o en una fracción lateral obtenida durante la purificación de IgG del plasma. Se han ejemplificado dos materiales de partida (Procedimiento 1 en el ejemplo 1 y Procedimiento 2 en el ejemplo 2).

Figura 2: Análisis por HPLC de la composición del material cargado (materia prima) para la cromatografía de intercambio aniónico, de acuerdo con el procedimiento 1 mostrado en la Figura 1. El eje x muestra el tiempo de elución y el eje y la absorbancia a 280 nm (mAu: mili-unidad de absorción).

35 Figura 3: Perfil de elución de la columna de intercambio aniónico, mostrando el volumen de retención en mililitros en el eje x, y la absorbancia a 280 nm (mAu: mili-unidad de absorción) en el eje y. Las soluciones de elución se indican sobre el perfil, las líneas verticales indican el cambio de solución aplicado a la columna.

Figura 4: Análisis por HPLC de la composición de la fracción F4A, de acuerdo con el Procedimiento 1.

Figura 5: Análisis por HPLC de la composición de F4 tras la eliminación de la IgG por cromatografía de afinidad.

40 Figura 6: Análisis por HPLC de la composición de la fracción F5 de IgG e IgM por cromatografía de afinidad.

Figura 7: Perfiles de elución del procedimiento de la columna de intercambio aniónico, utilizando diferentes tampones como tampón de elución 1. Las líneas verticales discontinuas indican el cambio de solución aplicado a la columna. *La carga para la elución en tampón de acetato se redujo.

45 Figura 8: Análisis del contenido de IgA e IgM en las fracciones obtenidas al realizar la elución 1 con diferentes tampones de elución en relación con la proteína total cargada.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitantes sirven para ilustrar la invención.

En los siguientes ejemplos, los materiales que se originan en el procedimiento de purificación de IgG a partir de plasma y/o fracciones de plasma se utilizan como material de partida para la presente invención. La Figura 1 muestra un

diagrama de flujo del procedimiento de purificación de IgG, e indica ejemplos del lugar en que puede introducirse en el procedimiento un procedimiento de purificación de IgA según la invención.

Brevemente, se llevan a cabo las siguientes etapas para purificar la IgG del plasma: El plasma o el plasma crio-pobre se somete a un fraccionamiento en frío con etanol, por ejemplo, de acuerdo con Cohn o Kistler - Nitschmann, y las fracciones que contienen inmunoglobulinas se procesan en forma adicional. Se realiza una precipitación con ácido octanoico y la suspensión que contiene la mayor parte de las IgG se somete a filtración, inactivación del virus y cromatografía de intercambio aniónico (AIEX). La mayor parte de la IgG se recoge en el flujo AIEX y se procesa en forma adicional, incluyendo la formulación final y el empaque.

Como se muestra en la Figura 1, un procedimiento de purificación de IgA de acuerdo con la invención puede ramificarse a partir de los fraccionamientos en etanol frío, por ejemplo, FI+II+III, el sobrenadante de FI, FII+III, el precipitado A, o sus subfracciones. Sin embargo, preferentemente, el material solubilizado del precipitado de ácido octanoico (torta de ácido octanoico) se somete a los procedimientos de la invención, o el material unido a la columna de intercambio aniónico se somete a una elución secuencial de acuerdo con la presente invención para obtener IgA plasmática. Son preferentes estos últimos materiales, ya que actualmente se desechan. La realización del procedimiento de purificación de IgA a partir de estos materiales no interfiere con el procedimiento de IgG, por lo que el rendimiento de IgG u otras proteínas plasmáticas no disminuye ni se ve comprometido de ninguna manera. No obstante, la invención no se limita a esos materiales de partida.

Ejemplo 1: Elución secuencial de IgA desde una columna de intercambio aniónico (AIEX) utilizando tampón tartrato como tampón de elución 1

El procedimiento de purificación de IgG a partir de plasma se llevó a cabo esencialmente como se muestra en la Figura 1 y se describió brevemente más arriba. En el procedimiento de purificación de IgG, la columna AIEX (MPHQ) se equilibra con dos tampones, utilizando acetato de sodio 0,78 M, pH $4,0 \pm 0,1$, conductividad 8 - 10 mS/cm para los primeros 2 volúmenes de columna (CV), seguido de acetato de sodio 8 CV 10 mM, pH $6,5 \pm 0,1$, conductividad 0,8 - 1,2 mS/cm. La Figura 2 muestra la composición de la materia prima AIEX, que se carga en la columna AIEX (aproximadamente 180 g de proteína por L de resina) y posteriormente se lava con 2 CV de tampón de equilibrio 2. Tras esta etapa, la columna AIEX se sometió a una elución secuencial.

Por lo tanto, se realizó una etapa de preelución utilizando un tampón de acetato de fosfato de 8 CV (fosfato 10mM + acetato de sodio 30mM, pH 6,0, conductividad 2-7 mS/cm). Como puede observarse en la Figura 3, durante la etapa de preelución se eluye la fracción F3, que contiene principalmente IgG.

Después de esta etapa de preelución, el tampón se cambió al primer tampón de elución (tartrato 5 - 8 CV 55mM, acetato de sodio 5mM, pH $7,6 \pm 0,2$, conductividad 5-15 mS/cm). Tras pasar al tampón tartrato se recoge la fracción F4, que contiene IgG e IgA en una proporción de aproximadamente 60:40, y está esencialmente desprovista de IgM. La IgA eluida en esta fracción es principalmente IgA monomérica. Como puede observarse en la Figura 3, en esta etapa se pueden recoger varias subfracciones (fracciones de pico) si se desea. La Figura 4 muestra la composición de la subfracción F4A. Sin embargo, todas las subfracciones contienen sólo IgG e IgA monomérica en diversas proporciones.

En adelante, se aplicaron 6 CV 50mM de fosfato y 25mM de citrato (pH 5,0, conductividad 5-15 mS/cm) como segundo tampón de elución. Tras pasar al segundo tampón de elución se eluye la fracción F5, que puede recogerse en dos subfracciones (fracciones de pico) (Figura 3), enriquecidas en IgA dimérica. La fracción F5 contiene IgM, IgA e IgG en una proporción de 20 - 30 % de IgA (predominantemente di/polimérica), 35 - 50 % de IgM y 20 - 35 % de IgG.

Las fracciones F4 y F5 se pulieron mediante cromatografía de afinidad (una o dos etapas) para eliminar selectivamente IgG e IgM. El análisis por HPLC mostró que el producto obtenido de la fracción F4 es una IgA monomérica altamente pura (Figura 5), mientras que la fracción F5 está enriquecida en IgA dimérica (Figura 6). Por lo tanto, este procedimiento de elución proporciona un excelente enriquecimiento para la IgA monomérica en la fracción F4 y la IgA dimérica en la fracción F5.

También se probaron otros materiales AIEX (Fractogel, HyperCel Star AX, Q HyperCel) y han dado perfiles de elución similares.

Ejemplo 2: Prueba de diferentes tampones para la primera etapa de elución

Se evaluaron varios tampones diferentes en la primera etapa de elución y se compararon con el perfil de elución del tampón de tartrato.

El experimento se realizó esencialmente como se describe en el Ejemplo 1, con una carga de proteínas entre 100 y 180 g de proteínas por L de resina AIEX. Sin embargo, para la primera elución, se sustituyó el tampón tartrato por el tampón oxalato, malonato, maleato, fosfato y acetato (55mM de cada sustancia + 5mM de acetato de sodio, pH $7,6 \pm 0,2$).

ES 2 919 861 T3

5 Los perfiles de elución resultantes se muestran en la Figura 7. La fracción F4 parece ser similar para todos los tampones siempre que se utilicen sustancias con al menos 2 grupos ácidos en la primera elución, mientras que los perfiles de elución de acetato y fosfato parecen bastante diferentes. Sin embargo, la primera elución también afecta a la segunda elución con tampón de citrato. Se puede observar que el tampón de oxalato produce un pico F5 similar (Figura 7). Con los tampones de malonato, maleato o fosfato, la IgM no se eluye durante la segunda elución. Con el tampón de acetato como primer tampón de elución, casi toda la IgA y la cantidad total de IgM se eluyen en F5.

10 La cantidad de IgA e IgM en estas fracciones en relación con la proteína total cargada se ilustra en la Figura 8. El tartrato y el oxalato proporcionan el perfil de elución preferente, donde la IgA monomérica se eluye en F4, y la IgM y la IgA dimérica se eluyen en F5. Sólo la elución con los ácidos hidroxídicos dio lugar a las 3 subfracciones F4 y a la elución de la IgA monomérica. La primera etapa de elución utilizando tampón fosfato mostró sólo 2 subfracciones y una elución extenuada de IgA, mientras que el tampón acetato generó un pico F4 con una pequeña cantidad de IgA. Si la primera elución se realiza con malonato, maleato o tampón fosfato se obtiene un gran pico en las fracciones de la banda, en la que se utilizan condiciones de elución exigentes (1M NaCl)

El contenido de inmunoglobulinas en las diferentes fracciones también se muestra en la Tabla 1:

E1: Tampón tartrato	IgG* [mg]	IgA** [mg]	IgM** [mg]
Carga	3250,8	139,51	47,76
pre E (F3)	137,2	3,79	0,04
E1 (F4)	117,6	90,27	0,87
E2 (F5)	37,32	26,29	49,42
BANDA	0	0,00	0,00
E1: Tampón oxalato	IgG* [mg]	IgA** [mg]	IgM** [mg]
Carga	3322,7	114,78	42,60
pre E (F3)	150,2	10,55	0,09
E1 (F4)	128,8	90,38	1,72
E2 (F5)	35,77	14,94	44,14
BANDA	0	1,90	2,79
E1: Tampón ácido malónico	IgG* [mg]	IgA** [mg]	IgM** [mg]
Carga	3325,8	133,68	50,99
pre E (F3)	140,2	5,94	0,14
E1 (F4)	123,4	101,25	1,38
E2 (F5)	20,26	11,24	7,22
BANDA	16,13	16,30	45,70
E1: Tampón ácido maleico	IgG* [mg]	IgA** [mg]	IgM** [mg]
Carga	3331,5	132,98	44,98

E1: Tampón ácido malónico	IgG* [mg]	IgA** [mg]	IgM** [mg]
pre E (F3)	141,2	4,95	0,06
E1 (F4)	119,7	112,80	1,23
E2 (F5)	11,43	7,17	4,75
BANDA	26,16	24,54	48,32
E1: Tampón fosfato			
E1: Tampón fosfato	IgG* [mg]	IgA** [mg]	IgM** [mg]
Carga	3412,2	132,19	46,98
pre E (F3)	145,15	5,69	0,05
E1 (F4)	109,1	73,61	0,34
E2 (F5B)	18,1	10,78	0,92
BANDA	34,4	42,09	45,80
E1: Tampón acetato*			
E1: Tampón acetato*	IgG* [mg]	IgA** [mg]	IgM** [mg]
Carga	1210	39,92	11,90
pre E (F3)	55,34	0,75	-
E1 (F4)	54,68	3,03	0,02
E2 (F5)	58,55	32,81	13,64
BANDA			-
* procedimiento de análisis nefelométrico, ** procedimiento de análisis ELISA			

5 Ventajosamente, se ha descubierto que el pH de tales tampones, por ejemplo el tampón tartrato, puede ser estabilizado mediante la adición de tampón Tris de pH $7,6 \pm 0,4$, a una concentración final de 1 a 20 mM, preferentemente de 2 a 15 mM, más preferentemente de 5 a 10 mM.

Ejemplo 3: Solubilización de la IgA a partir del precipitado de ácido octanoico

10 Como se muestra en la Figura 1, el precipitado de ácido octanoico (torta de OA) es otra fracción de desecho que se produce durante el procedimiento de purificación de IgG. Se comprobó que este precipitado contenía cantidades significativas de IgA y, por tanto, es un buen material de partida para la purificación de la IgA.

15 La torta de OA se mezcló con tampón fosfato 0,15M, pH 4,8 en una proporción de 1:6 (precipitado de OA a tampón). Sin embargo, también se pueden utilizar otros tampones para la extracción de IgA, por ejemplo, el tampón Tris. El material solubilizado se sometió a filtración y se cargó en una columna AIEX (MPHQ). A continuación, la columna se eluyó secuencialmente como se describe en el ejemplo 1. El perfil de elución es esencialmente como ya se ha mostrado en la Figura 3.

La composición de la materia prima que comprende IgA para la columna AIEX varía en la proporción de IgG a IgA en comparación con el ejemplo 1 descrito. Como se muestra en la Tabla 2, la proporción de IgG a IgA en la fracción F4

se ha desplazado a favor de la IgA (15 %:85 %). También aumenta la cantidad de IgA en la fracción F3 previa a la elución. Ambas fracciones carecen de IgM.

La elución de los compuestos diméricos/poliméricos está limitada por la composición del material de partida.

El contenido de inmunoglobulinas en las diferentes fracciones también se muestra en la Tabla 2:

	IgG* [mg]	IgA** [mg]	IgM** [mg]
Carga	380,80	271,86	4,84
pre E (F3)	28,17	57,34	0,01
E1 (F4)	20,09	109,78	0,07
E2 (F5)	7,43	12,80	6,32
BANDA	0,30	1,08	0,03
* procedimiento de análisis nefelométrico, ** procedimiento de análisis ELISA			

5

Para demostrar que esto también funciona con otros precipitados que comprenden IgA, también se han probado otros precipitados. La IgA también pudo solubilizarse a partir de dos precipitados de etanol diferentes y someterse a la cromatografía ALEX, y se obtuvieron perfiles de elución muy similares con el procedimiento de la invención.

Ejemplo 4: Pulido de la IgA monomérica

10 La elución secuencial dio como resultado una fracción monomérica de IgA enriquecida (F4) que contenía IgG como contaminante. Se realizó una etapa de pulido mediante una eliminación selectiva de IgG por cromatografía de afinidad (IgSelect).

15 La fracción F4 se recogió en dos subfracciones F4A y F4B (Figura 3). Sin embargo, la fracción F4A obtenida se sometió a ultrafiltración/diafiltración para concentrar la proteína y transferirla a un sistema tampón común con pH neutro, preferentemente PBS (solución salina tamponada con fosfato). Esta solución proteica se utilizó como materia prima para la cromatografía de afinidad. La IgA no se une a la resina de afinidad y se recoge en la fracción flow-through. La IgG unida se eluyó con tampón de glicina 0,1 M, pH 3,0. Por último, el producto de IgA puede formularse en una composición farmacéutica estable. La Figura 5 muestra la fracción de IgA pulida sin IgG (e IgM).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para enriquecer la IgA a partir de una composición que comprende IgA, que comprende las siguientes etapas:
 - (a) cargar la composición en un intercambiador aniónico bajo condiciones que permiten la unión de la IgA;
 - 5 (b) aplicar una solución de elución alcalina que comprende una sustancia seleccionada del grupo que consiste en ácido tartárico o tartrato, ácido oxálico u oxalato, ácido malónico o malonato, ácido maleico o maleato y ácido cítrico o citrato;
 - (c) opcionalmente aplicar una solución de elución ácida que comprende un competidor fuerte para el intercambiador aniónico, en el que el competidor fuerte para el intercambiador aniónico se selecciona entre
 - 10 citrato, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico y sales de sulfatos de hidrógeno o sus mezclas,
 en el que la proteína eluida durante la etapa (b) está enriquecida para la IgA monomérica.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que entre las etapas (a) y (b), se lleva a cabo una etapa de preelución (a1) aplicando una solución de baja conductividad al intercambiador aniónico, en el que la baja conductividad se refiere a una conductividad inferior a 1,5 S/m (15 mS/cm).
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la etapa (a1) se realiza a un pH débilmente ácido/neutro, en el que el pH débilmente ácido se refiere a un intervalo de pH de 4,0 a 6,5, y el pH neutro se refiere a un intervalo de pH de 6,0 a 7,5.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el eluido recogido durante la etapa (b) está esencialmente desprovisto de IgM.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la proteína eluida en la etapa (c) está enriquecida en IgA dimérica.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el competidor fuerte para el intercambiador aniónico en la etapa (c) es citrato.
7. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que el intercambiador aniónico es un intercambiador aniónico fuerte o un intercambiador aniónico débil.
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el intercambiador iónico comprende un ligando de intercambio aniónico, tal como un amonio cuaternario, aminoetil, dietilaminoetil, trimetilaminoetil, o dimetilaminoetil cuaternarios.
9. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la composición que comprende IgA es o se deriva de sangre, suero, plasma u otros fluidos biológicos.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la composición que comprende IgA es una solución de un precipitado intermedio del fraccionamiento del plasma o una fracción lateral obtenida durante la purificación de IgG del plasma.
- 30 11. El procedimiento de la reivindicación 9 o de la reivindicación 10, en el que la composición que comprende IgA es un intermedio en un procedimiento de purificación de IgG, y en el que las etapas (a) y (b) del procedimiento de la reivindicación 1 se realizan en un intercambiador aniónico que forma parte del procedimiento de producción de IgG.
- 35 12. El procedimiento de la reivindicación 9 o de la reivindicación 10, en el que la composición que comprende IgA se obtiene por solubilización de un precipitado.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el precipitado es un precipitado de ácido octanoico obtenido durante la purificación de IgG.
- 40 14. El procedimiento de la reivindicación 12 o de la reivindicación 13, en el que la etapa de solubilización pone selectivamente en solución la IgA y la IgG.
15. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la solubilización se lleva a cabo utilizando una solución con una conductividad de entre 0,1 y 1,5 S/m (1 y 15 mS/cm), y un pH de 3,5 a 6 o de 7 a 9,5.
16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que la solubilización se lleva a cabo con un tampón de fosfato, un tampón de acetato, un tampón de Tris, y/o una combinación de dos o más de estos tampones.
- 45 17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el tampón se selecciona entre tampón de acetato 0,22M o tampón de fosfato 0,15M, pH 4,8.

Fig. 1

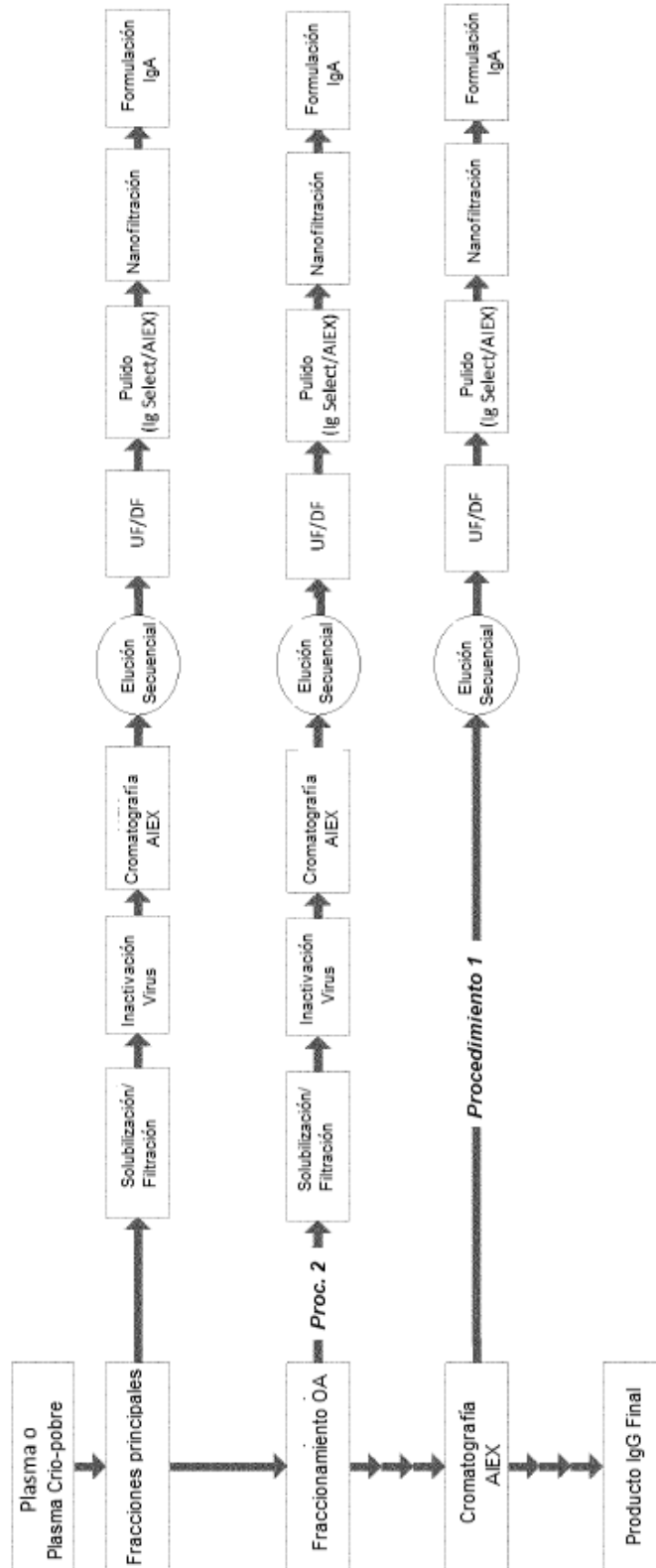


Fig. 2

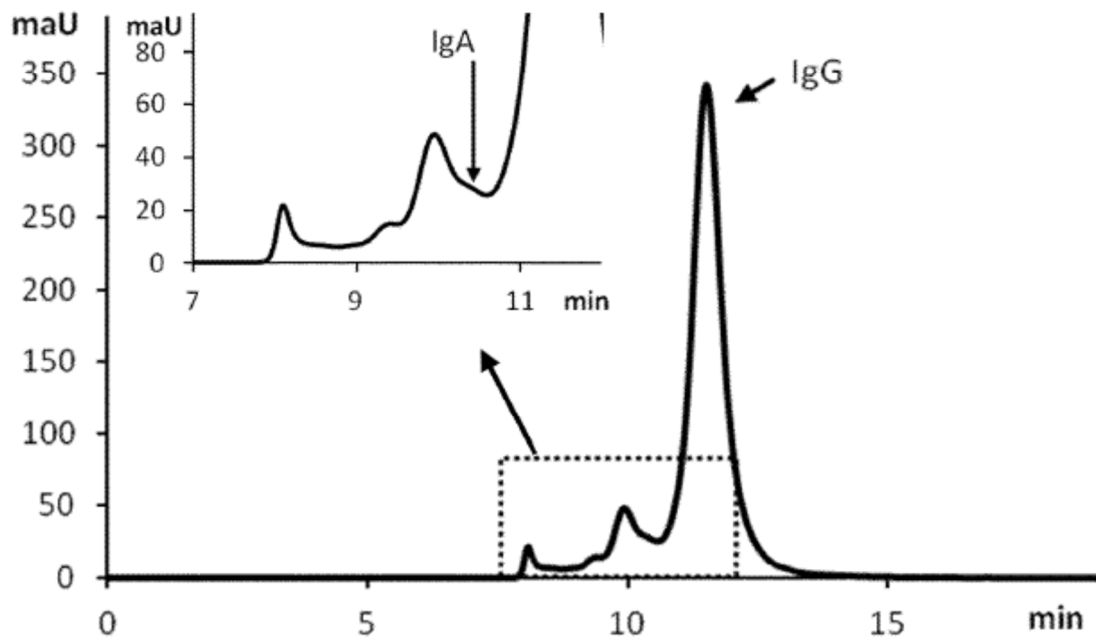


Fig. 3

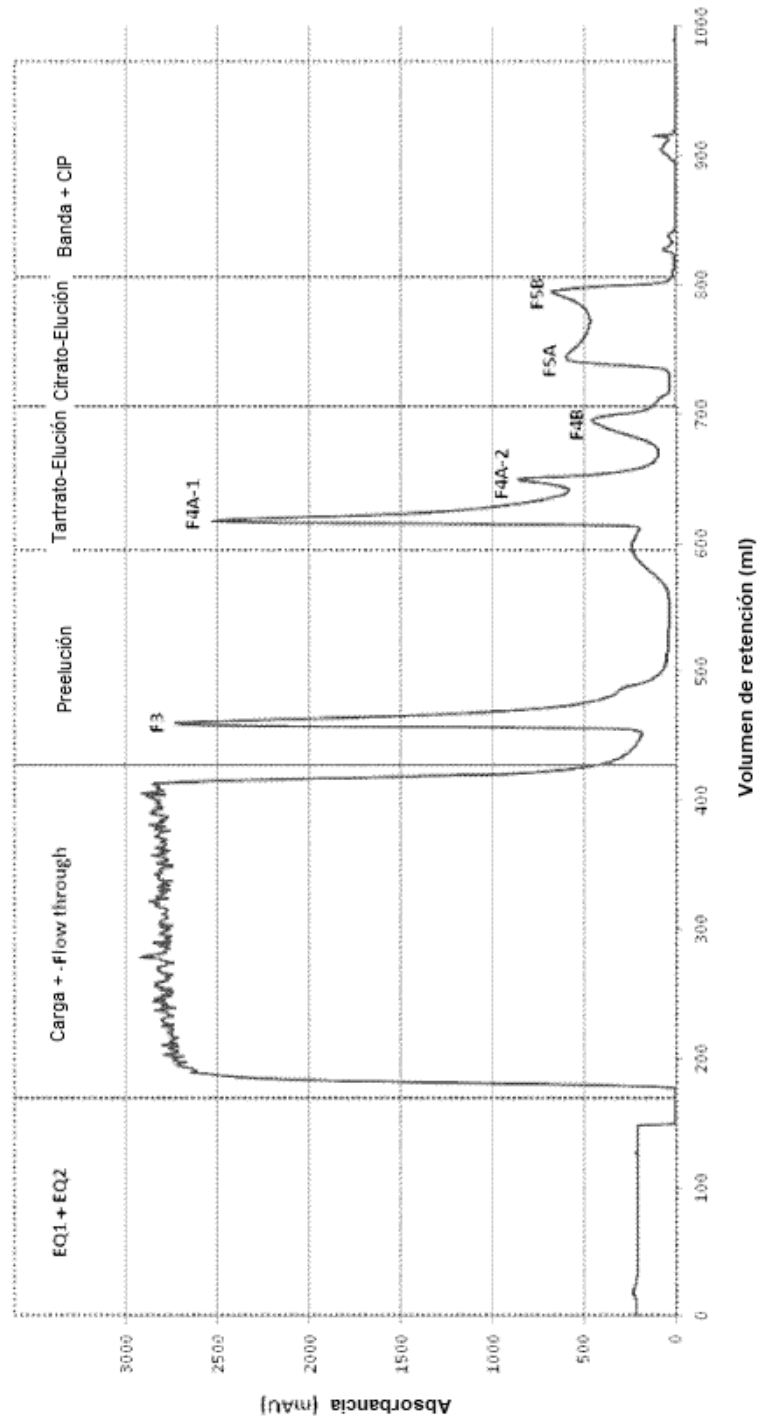


Fig. 4

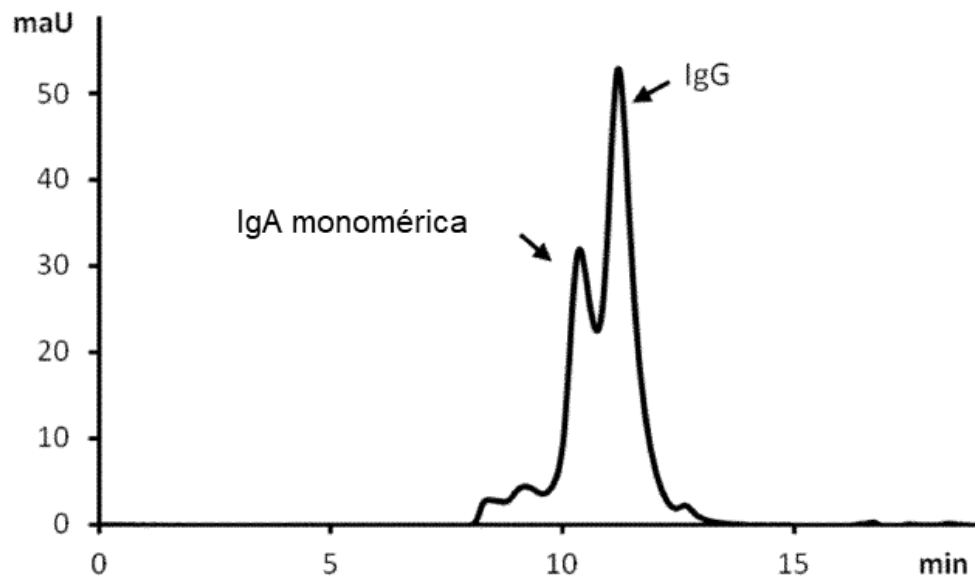


Fig. 5

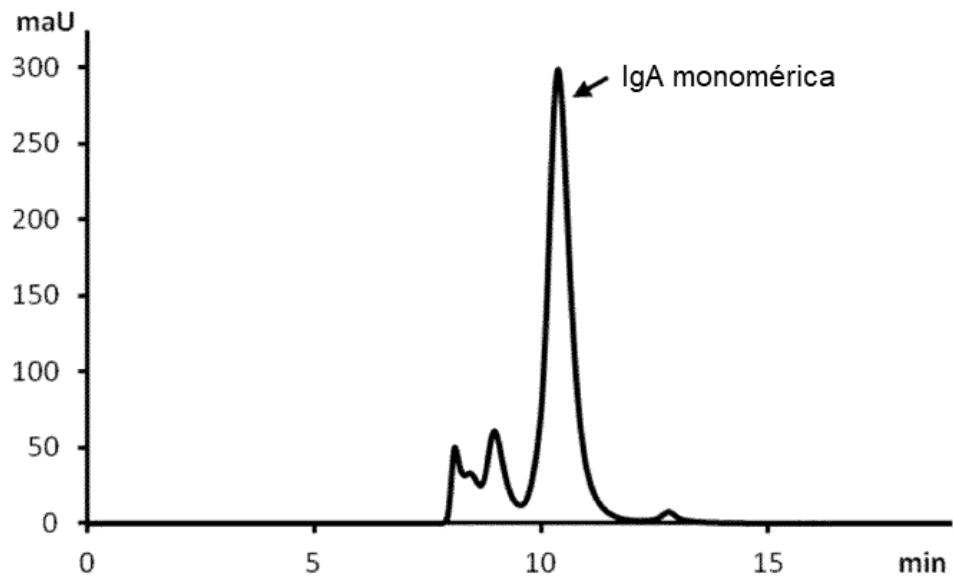


Fig. 6

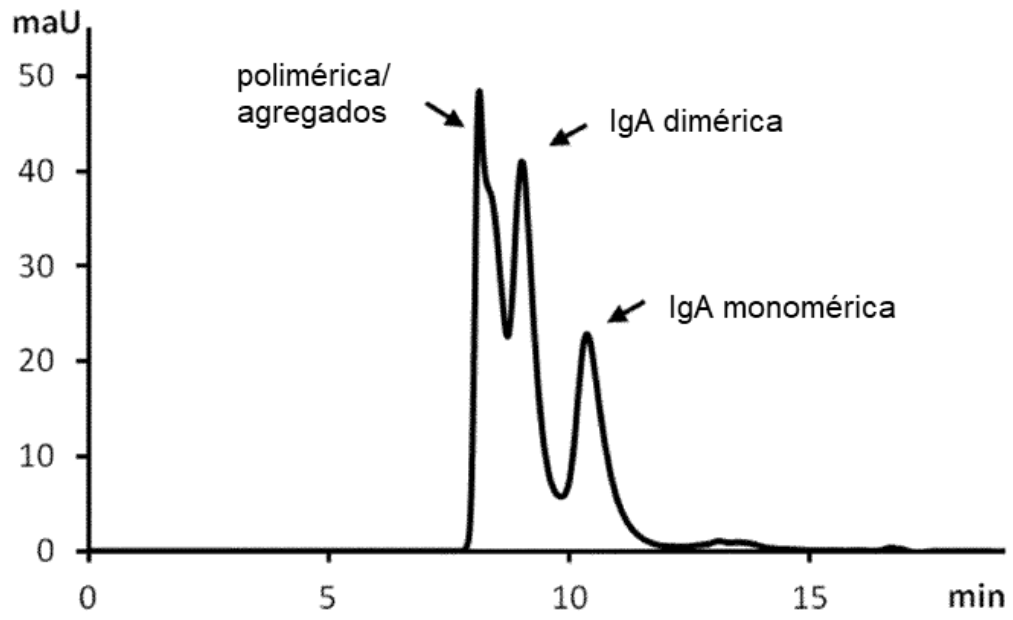


Fig. 7a

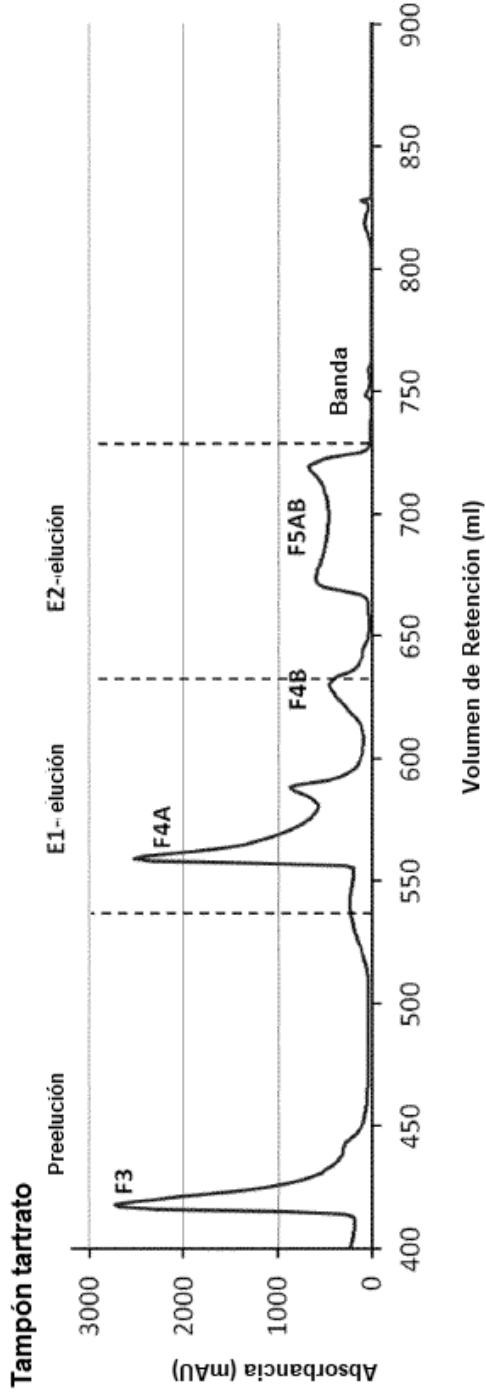


Fig. 7b

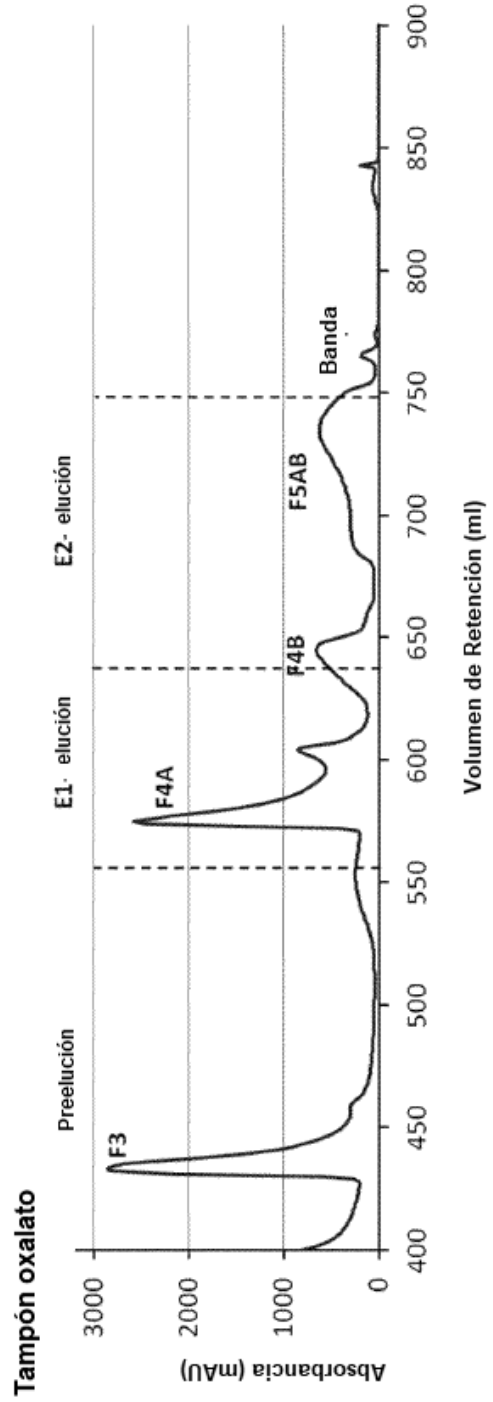


Fig. 7c

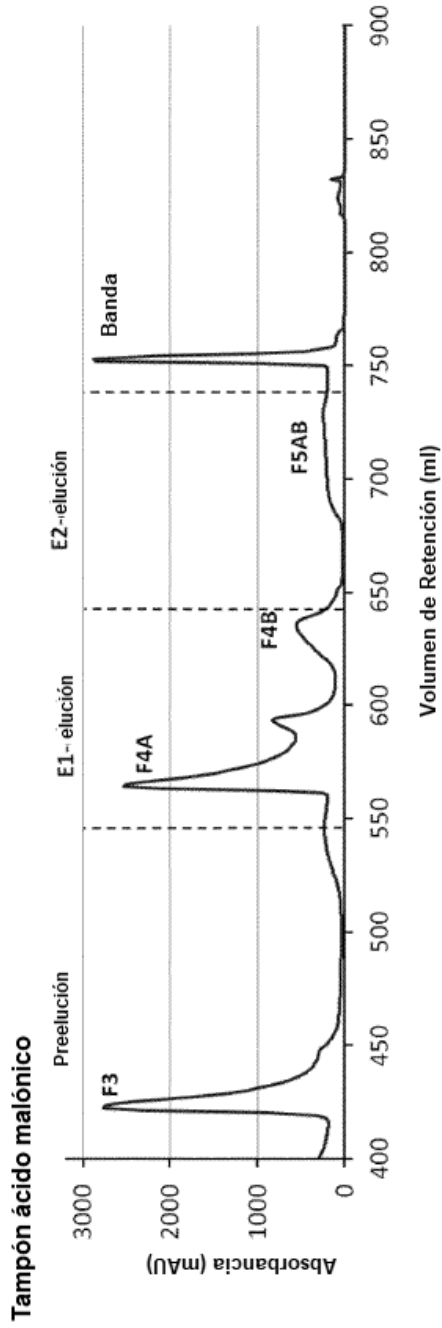


Fig. 7d

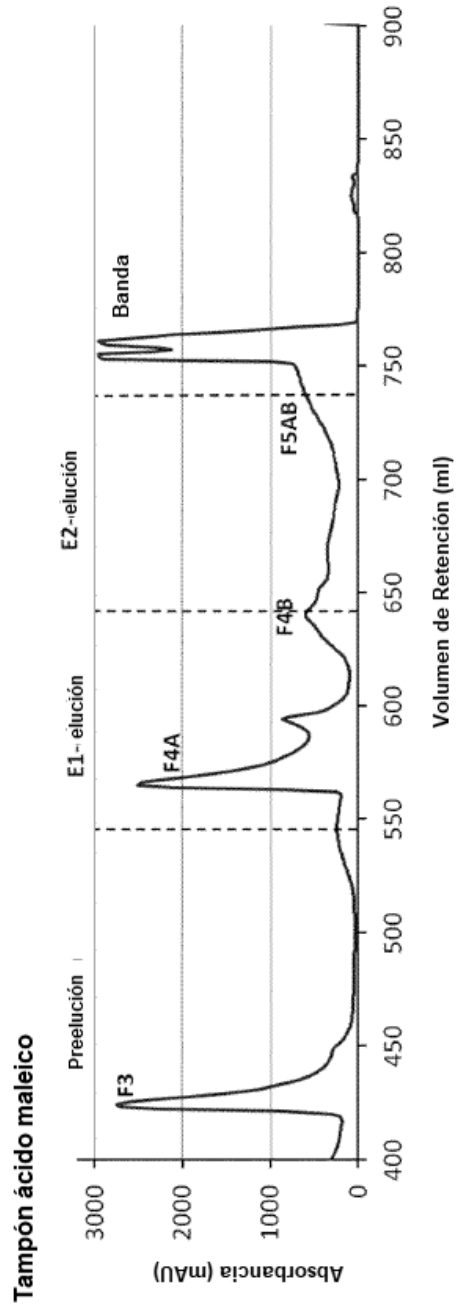


Fig. 7e

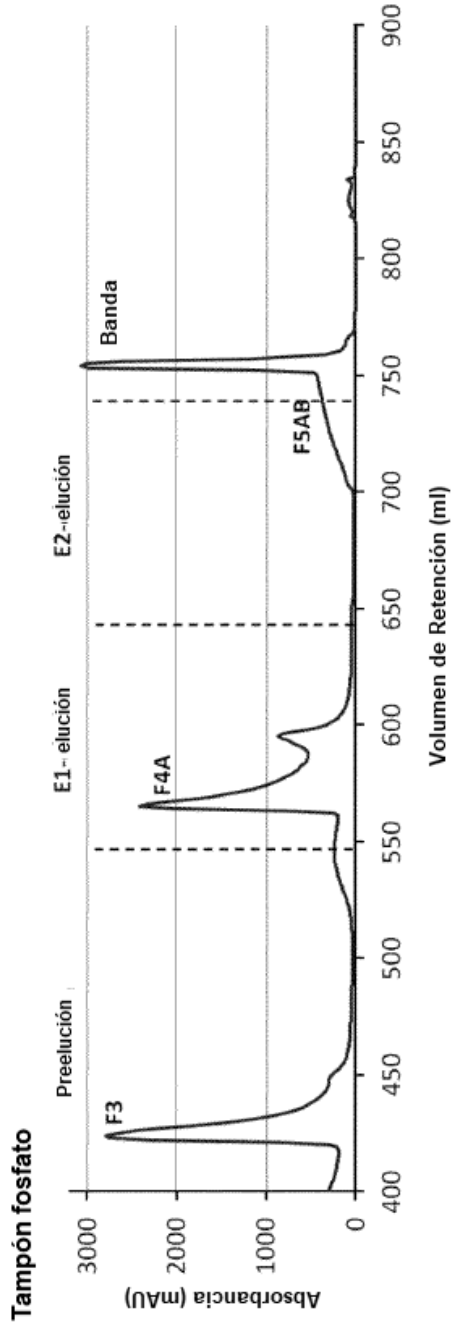


Fig. 7f

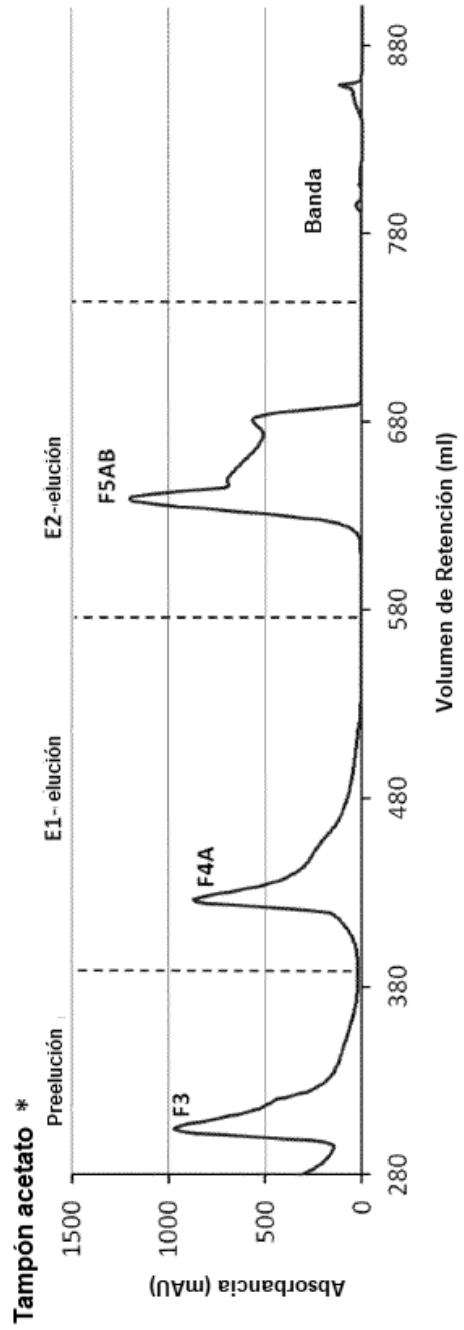


Fig. 8a

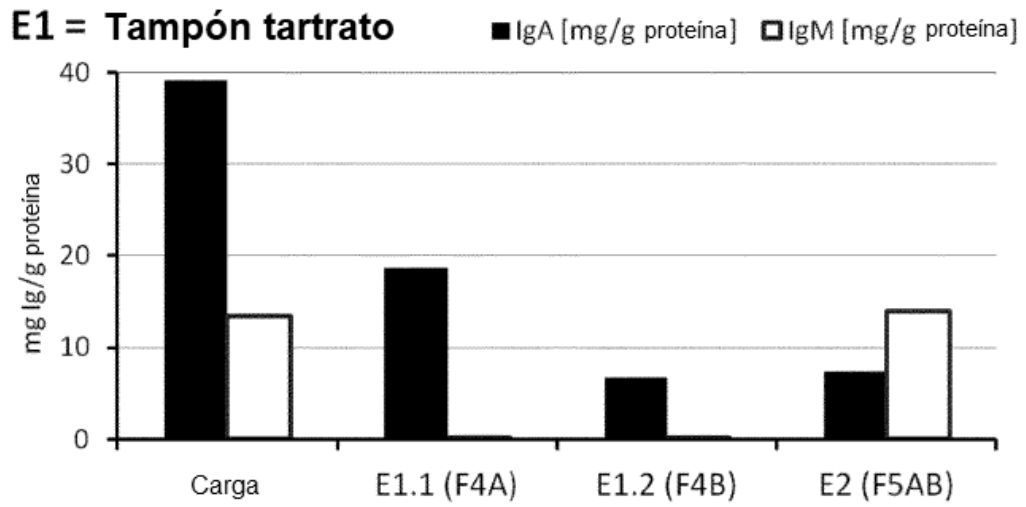


Fig. 8b

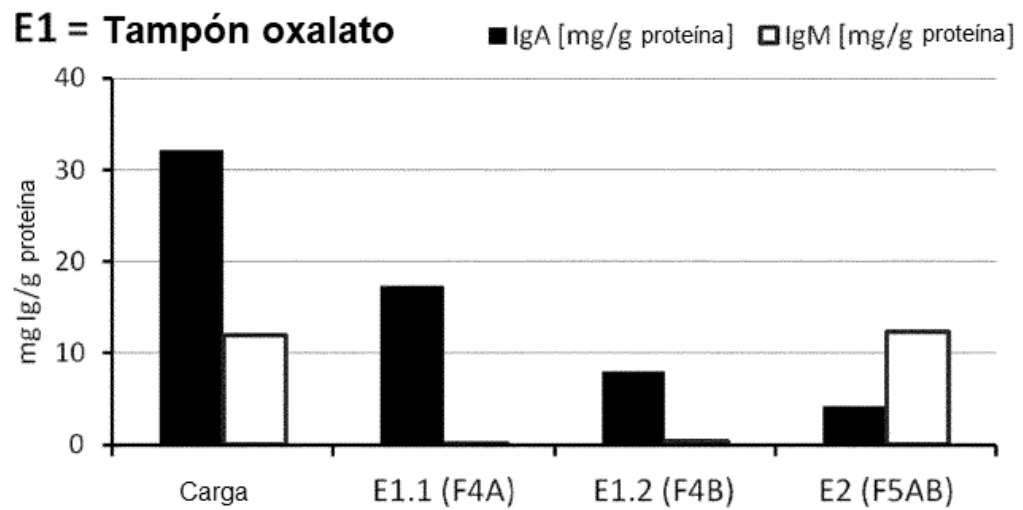


Fig. 8c

E1 = Tampón ácido malónico ■ IgA [mg/g proteína] □ IgM [mg/g proteína]

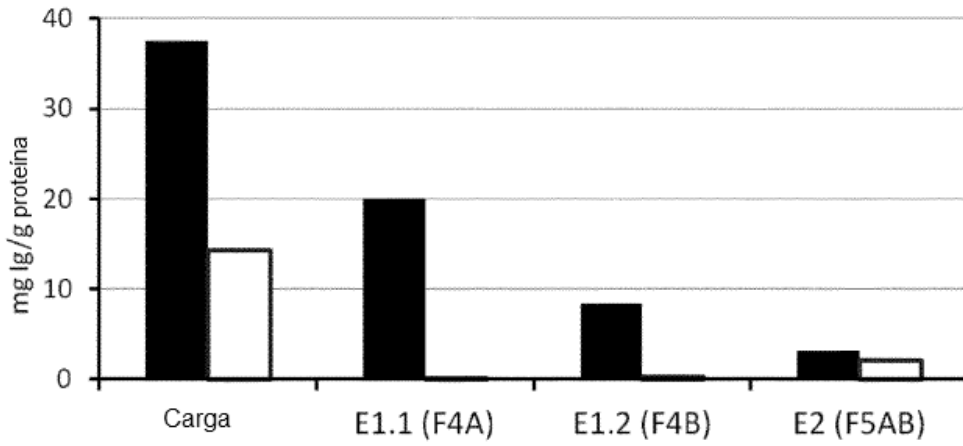


Fig. 8d

E1 = Tampón ácido maleico ■ IgA [mg/g proteína] □ IgM [mg/g proteína]

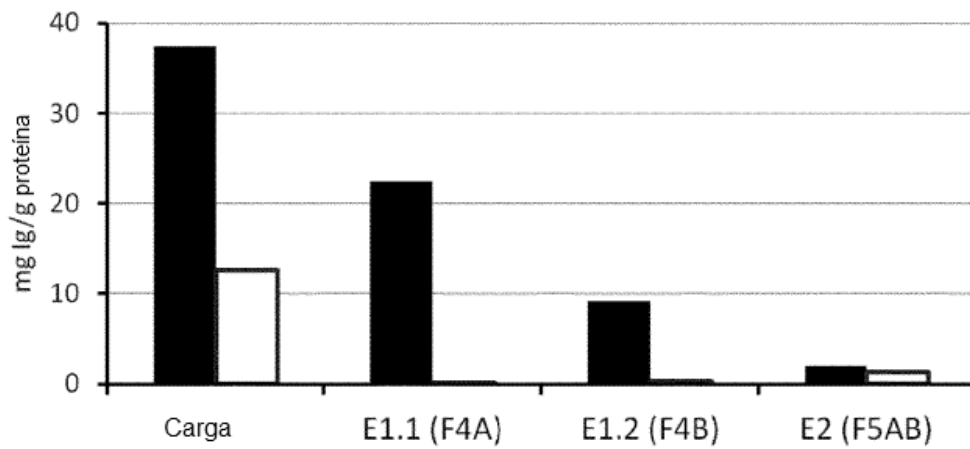


Fig. 8e

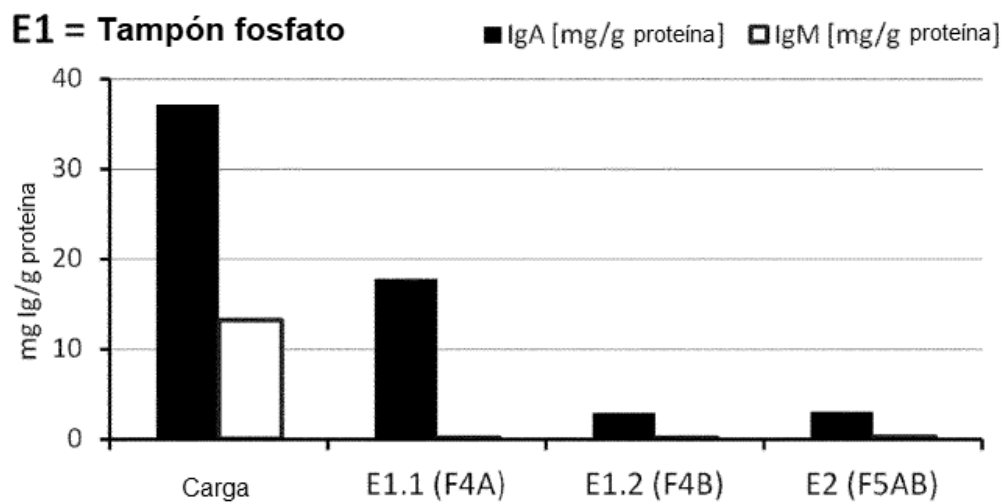


Fig. 8f

