



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 272 067**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99924806 .5**  
86 Fecha de presentación : **10.06.1999**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1084143**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.03.2001**

54 Título: **Procedimiento de purificación para la producción de lecitina de unión a manano y un producto medicinal de MBL.**

30 Prioridad: **10.06.1998 DK 1998 00793**  
**18.09.1998 US 101007 P**

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

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2007**

72 Inventor/es: **Laursen, Inga**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2007**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

**ES 2 272 067 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 purificación para la producción de lecitina de unión a manano y un producto medicinal de MBL.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la producción de lectina de unión a manano (MBL) (antiguamente denominada proteína de unión a manano, MBP) preferiblemente de plasma de un donante, para su uso como un producto medicinal de MBL. Debe usarse una formulación farmacéutica del producto para terapia de sustitución o de remplazo en pacientes con deficiencia de MBL hereditaria o adquirida asociada con síntomas funcionales y/o clínicos, es decir, donde se contempla que dichos pacientes se beneficiarían de la administración de MBL, por ejemplo, para el tratamiento o prevención de infecciones.

15 **Introducción**

Las funciones inmunes innatas (también denominadas naturales o no anticipatorias) han recibido recientemente un interés creciente como elementos importantes en los mecanismos de defensa contra microorganismos potencialmente patógenos. Por tanto, se ha prestado especial atención a un grupo de lectinas, las colectinas, que se cree que juegan un papel importante en la defensa inmediata contra un amplio intervalo de microorganismos. La proteína sérica MBL es una colectina, es decir, está constituida como estructuras oligoméricas, caracterizadas por dominios de reconocimiento de carbohidratos de tipo C (CDR) dependientes de calcio unidos a varas de colágeno. La oligomerización precisa de MBL circulante permanece poco clara, sin embargo, las estructuras oligoméricas de orden superior en forma de ramillete, tales como MBL hexamérica con múltiples sitios de unión, parece que son esenciales para la actividad funcional de MBL (para revisiones recientes, véanse las referencias 1, 2) (se da una lista de las referencias al final de esta memoria descriptiva).

El conocimiento acumulativo sobre MBL indica un futuro papel para esta proteína en la terapia de intervención contra infecciones graves. MBL es estructuralmente similar al componente del complemento C1q, un componente esencial en la activación de la vía clásica del complemento. Parece que MBL activa el sistema del complemento por un mecanismo análogo al de C1q, es decir, mediante serín proteasas asociadas; denominadas MASP (serín proteasas asociadas a MBL). Esta activación del complemento independiente de anticuerpos se ha llamado "la vía de activación de complemento por MB-lectina" (3, 4). MBL se une a estructuras de carbohidrato sobre superficies de bacterias, levaduras, protozoos parasitarios y virus, y se ha descubierto que muestra actividad antibacteriana eliminando las bacterias a través de la vía citolítica, terminal del sistema del complemento, o a través de la promoción de la fagocitosis por opsonización. El nivel de MBL en plasma está determinado genéticamente. Cada individuo tiene un nivel de MBL constitucional reflejado por la estructura genómica en la región de control así como en la región codificante. La concentración de MBL en plasma por tanto varía entre aproximadamente 10  $\mu\text{g/ml}$  a menos de 10  $\text{ng/ml}$ . Los niños o adultos con deficiencia o con niveles muy bajos de MBL son especialmente susceptibles a infecciones. Informaciones recientes apuntan a un papel de la deficiencia de MBL como un factor de susceptibilidad en la infección por VIH, y también se asocia la deficiencia de MBL a una muerte más rápida después del desarrollo del SIDA (1). La deficiencia de MBL también puede predisponer a abortos espontáneos recurrentes (5).

La lectina de unión a manano se aisló por primera vez de suero humano en 1983 (6) por cromatografía de afinidad en Sepharose-manano (manano unido a una matriz de Sepharose) en presencia de iones Ca. La elución de MBL de la columna de afinidad se realizó mediante EDTA.

Parece a partir de publicaciones posteriores que MBL se ha purificado de suero y plasma esencialmente por el mismo procedimiento. Las preparaciones de MBL purificada recuperadas por este procedimiento de una etapa estaban altamente contaminadas por anticuerpos con especificidad por carbohidratos y componente-p amiloide sérico (SAP). Para obtener MBL de pureza mayor, se incluyeron etapas adicionales de cromatografía en los procedimientos de purificación, tal como una precolumna de Sepharose en la columna de afinidad, y etapas de afinidad adicionales usando diferentes carbohidratos unidos a la matriz o añadidos al tampón de elución; también se emplearon otros principios cromatográficos como intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel (7, 8, 9, 10). En general, se han empleado al menos dos etapas cromatográficas de afinidad en los procedimientos para obtener MBL altamente purificada. Se ha descrito recientemente un procedimiento por Tan y col., en el que una fracción de proteínas plasmáticas obtenida por precipitación de plasma humano con PEG al 7% se usó como material de partida para la purificación de MBL (11). Este procedimiento difería de los descritos previamente porque la cromatografía de afinidad se realizó en Sepharose no conjugada no reticulada (Sepharose sin ligandos de carbohidratos inmovilizados): primero el precipitado de PEG solubilizado se sometió a adsorción discontinua en Sepharose, y después de la elución de MBL por EDTA, se realizó una etapa posterior de cromatografía de afinidad en una columna de Sepharose, eluyendo MBL por manosa. Mediante este procedimiento empleando dos etapas consecutivas de afinidad, se obtuvo MBL con elevada pureza.

Sin embargo, el producto de Tan y col. (11) contiene inhibidores de proteasa sintéticos. Los tampones usados para la etapa de cromatografía de afinidad en Tan y col. se ajustaron con inhibidores de proteasa, tales como Pefabloc y Fenantrolina. Cuando se precipitan proteínas plasmáticas con PEG, se sabe bien que el fibrinógeno precipitará como la primera proteína plasmática. Por lo tanto, el precipitado de PEG que constituye el material de partida además de MBL inducirá fibrinógeno. Se sabe bien que la escisión proteolítica de fibrinógeno que conduce a la formación de puntos de fibrina, agregados/coágulos de fibrina producirá problemas durante la cromatografía en columna cuando se

usan tampones que contienen  $\text{Ca}^{2+}$  conduciendo a la contaminación de la matriz y en el mejor de los casos la pérdida incontrolada de fibrina durante el lavado y la elución. Esto hará que el procedimiento descrito por Tan y col. sea imposible de realizar si no se añaden inhibidores de proteasa a los tampones. EMEA y otras directrices de autoridades reguladoras de la salud restringen el uso de agentes químicos en el procedimiento de purificación así como en el producto final. Por tanto, el producto obtenido por el procedimiento de Tan y col. no es adecuado para uso médico, debido al contenido, incluso en cantidades traza, de inhibidores de proteasa sintéticos.

Se describe un producto de MBL terapéutico recombinante en la Patente de Estados Unidos 5.270.199 de Ezekowitz (14). Sin embargo, este producto no contiene el complejo MBL-MASP crítico para activar el sistema del complemento (1). Por tanto, no contiene MBL oligomérica funcionalmente activa.

Koppel y col. (15) proporcionan un procedimiento para la purificación de MBL para su uso como una herramienta de diagnóstico, en particular en la identificación de cantidades muy bajas de IgM como alternativa al uso de anticuerpos anti-IgM. Además proporciona un producto que comprende MBL purificada de suero de conejo.

Kilpatrick (16) proporciona un procedimiento para la purificación de MBL humana. Sin embargo, se añaden a la preparación cantidades significativas de un agente bacteriostático, azida sódica. Estudios toxicológicos sobre azida sódica han revelado lesiones histopatológicas en el cerebro (necrosis del cerebro y del tálamo) y en el pulmón (congestión, hemorragia, y edema). En el documento WO98/01519 se describe ADN que codifica proteína humana de unión a manosa.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para purificar lectina de unión a manosa (MBL), preferiblemente de una fracción de proteínas plasmáticas bruta. El procedimiento de la invención incluirá, entre otros elementos, al menos dos elementos clave: realizar una etapa de cromatografía de afinidad sobre una matriz de polisacárido no conjugado reticulado, y realizar al menos una etapa validada de reducción de virus.

La invención también se refiere a una formulación farmacéutica de un producto de MBL oligomérico funcionalmente activo, totalmente libre de inhibidores de proteasa sintéticos y/o agentes bacteriostáticos. En aspectos adicionales, la invención está relacionada con dicha formulación de un producto de MBL para su uso en medicina y para el uso de dicha formulación para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con deficiencia de MBL congénita, hereditaria o adquirida en un mamífero.

MBL se puede purificar de un amplio intervalo de materiales de partida que contienen MBL. En una realización, el material de partida para el procedimiento de la invención es un sobrenadante que contiene MBL o una suspensión de células lisadas de un cultivo celular de levaduras o de mamífero que expresan MBL, comprendiendo dicho cultivo celular células que codifican MBL de mamífero (por ejemplo, humana) y que opcionalmente codifican las Serín Proteasas Asociadas a MBL (MASP). El cultivo celular que expresa MBL crece en un medio que proporciona al cultivo celular los nutrientes necesarios con o sin suero añadido al medio de cultivo. En otra realización, MBL se purifica de leche y/o calostro de un mamífero que expresa un gen de MBL de mamífero (por ejemplo humano). En una realización, el mamífero es un mamífero transgénico no humano. En una realización preferida de la invención, el material de partida para el procedimiento de la invención es una fracción de proteínas plasmáticas bruta que se puede obtener por procedimientos de fraccionamiento con etanol a escala industrial, tal como la fracción de Cohn I, II, III; la fracción de Cohn II y III; o la fracción de Cohn III: En una realización preferida, la fracción de proteínas plasmáticas es la fracción de Cohn II y III, en la que puede o no estar presente el coadyuvante de filtración dependiendo del procedimiento empleado para el aislamiento de la fracción de Cohn, es decir, por filtración o centrifugación. El uso de la fracción de Cohn II y III como material de partida tiene varias ventajas. Éstas comprenden, pero sin limitación: no se necesita fraccionamiento con etanol adicional, las inmunoglobulinas se pueden revestir para un producto de inmunoglobulina, y MBL se recupera de una fracción habitualmente desechada.

Cada uno de los materiales de partida requerirá unas pocas etapas de preprocesado para obtener una solución que contenga MBL. Las etapas de preprocesado se analizarán a continuación.

El primer elemento clave del presente procedimiento, la cromatografía de afinidad sobre una matriz de polisacárido no conjugado reticulado, tiene varias ventajas. Éstas comprenden, pero sin limitación: no se necesita precipitación de proteínas anterior, selectividad por MBL funcionalmente activa, un alto grado de purificación, retirada de virus, concentración por reducción de volúmenes.

La solución que contiene MBL es una mezcla de proteínas compleja, en la que MBL puede constituir menos del 0,05% de las proteínas totales de los materiales de partida. La purificación mediante procedimientos cromatográficos alternativos a la cromatografía de afinidad requeriría fraccionamiento adicional de proteínas de la solución que contiene MBL, por ejemplo por precipitación de proteínas. La ventaja del empleo de una etapa de afinidad es que no se necesitan etapas de fraccionamiento de proteínas anteriores, tales como etapas de precipitación y resuspensión, permitiendo de este modo que la solución que contiene MBL se aplique directamente a la columna.

## ES 2 272 067 T3

Como consecuencia de las etapas de preprocesado, por ejemplo, el fraccionamiento con etanol o la naturaleza del sistema de expresión de MBL usado, se espera que la solución que contiene MBL contenga MBL como proteínas oligoméricas nativas así como formas proteicas desnaturadas y estructuralmente alteradas. Como el producto de MBL para su uso en medicina tiene que estar constituido por MBL funcionalmente activa, es de gran importancia realizar una etapa de purificación que seleccione por funcionalidad. La cromatografía de afinidad cumple este requisito seleccionando MBL oligomérica de unión a ligando funcionalmente activa.

Se sabe bien que la cromatografía de afinidad es el procedimiento de elección para purificar proteínas de una mezcla compleja de proteínas produciendo a menudo purificaciones de varios miles de veces. Mediante la etapa de cromatografía de afinidad de la presente invención, se purifica MBL a un grado muy elevado, es decir, más de 2500 veces. La cromatografía de afinidad es la etapa de purificación principal de este procedimiento, y contribuye casi exclusivamente a la elevada pureza obtenida en la preparación final de MBL del procedimiento. Incluso la purificación en menor grado está mucho más allá de lo que se conoce actualmente en la técnica. También es aceptable una purificación de 500 veces; es decir 1000, 1500, 2000 o 2250 veces. La purificación en un menor grado es especialmente aceptable cuando se usan mezclas de proteínas menos complejas como material de partida. Es decir, si MBL constituye más de aproximadamente el 0,05% del contenido total de proteínas.

Aunque la solución que contiene MBL aplicada a la columna se puede haber concentrado, la concentración de la MBL es aún relativamente baja, y la cromatografía de afinidad sirve como una etapa de concentración, concentrando la MBL aplicada al menos 3 veces, tal como concentrando la MBL aplicada al menos 4 veces.

La etapa de cromatografía de afinidad se realiza sobre una matriz basada en polisacárido no conjugada. Por una matriz no conjugada se entiende que no hay ligandos de carbohidratos unidos a la matriz. Las ventajas comprenden, pero sin limitación: la estructura básica del medio usado como matriz consta de haces de cadenas de polisacáridos, que actúan como ligandos para MBL, no hay necesidad de una fabricación especial de una matriz por unión química de ligandos de carbohidratos, se evitan los problemas de una matriz inestable y/o pérdidas incontroladas de ligandos.

Además, la matriz está reticulada. La ventaja de un material de polisacárido reticulado es la rigidez y la alta estabilidad física, posibilitando el uso de una columna grande con buenas propiedades de flujo en el procedimiento. La matriz reticulada además tiene la ventaja de una estabilidad química elevada, posibilitando la limpieza de la columna con, por ejemplo, soluciones alcalinas fuertes. Los materiales preferidos para la etapa de cromatografía de afinidad son materiales de gel que contienen agarosa y/o dextrano y/o celulosa tales como Sepharose CL6B (Farmacia), Ultrogel (Farmacia), materiales de Bio-gel A, por ejemplo 0,5 m, 1,5 m, 15 m y 50 m (todos Bio-Rad), materiales de gel Sephadex, por ejemplo G-50, G-75, G-100, G-150 y G-200 (todos de Farmacia), materiales de gel Sephacryl HR, por ejemplo S-300, S-400, S-500 (todos de Farmacia), Superdex 200 prep grade (Farmacia), Superose 6 prep grade (Farmacia), y material de gel de Celulosa de Whatman, siendo materiales especialmente preferidos para la etapa de cromatografía de afinidad la Sepharose CL4B (Farmacia).

Preferiblemente, la columna se limpia con NaOH 0,5 M para asegurar condiciones de producción asépticas y evitar la contaminación lote a lote. Los especialistas en la técnica apreciarán la ventaja de este procedimiento de limpieza y el uso de un material de matriz para muchos ciclos de cromatografía.

Después de la aplicación de la solución que contiene MBL a la matriz de afinidad, se lava la columna. Los tampones usados para eliminar de la matriz de afinidad los contaminantes proteicos son tampones no desnaturantes que tienen una composición, pH y fuerza iónica que provocan la eliminación de la proporción principal de los contaminantes proteicos sin elución sustancial de MBL. Inicialmente, se usa un tampón de equilibrado. Este tampón podría ser un tampón Tris con una molaridad en el intervalo de 10-40 mM, preferiblemente 10 mM, y un pH de 7,0-8,0, preferiblemente 7,3, con un contenido de NaCl que varía de 100-250 mM, preferiblemente 145 mM; y un contenido de CaCl<sub>2</sub> de 3-15 mM, preferiblemente 5 mM. Posteriormente, se usa un tampón con un contenido bajo de CaCl<sub>2</sub>. El bajo contenido de CaCl<sub>2</sub> podría ser 0,2-2,0 mM, preferiblemente 0,3-1,0 mM, tal como 0,5 mM. Debido al empleo de una matriz a la que la MBL se une con una afinidad elevada de manera dependiente de Ca<sup>2+</sup>, la concentración de CaCl<sub>2</sub> se puede disminuir en el tampón de lavado después de que se haya establecido una adsorción estable de la MBL a la matriz sin elución sustancial de MBL. De esta manera, los contaminantes que se unen a la matriz con menor afinidad de forma dependiente de Ca<sup>2+</sup>, por ejemplo, anticuerpos específicos para carbohidratos, se eliminan.

La capacidad de unión de la columna se define como la cantidad total de MBL absorbida a y eluida de la matriz (calculada como un volumen de la fracción eluida multiplicado por la concentración) dividida por el volumen de la matriz de gel. Se prefiere que la capacidad de unión de la columna sea más de 20 µg MBL/ml de matriz cargada, por ejemplo, más de 25 µg MBL/ml de matriz cargada, tal como más de 30 µg MBL/ml de matriz cargada, más de 35 µg MBL/ml de matriz cargada, más de 40 µg MBL/ml de matriz cargada, más de 42 µg MBL/ml de matriz cargada, más de 44 µg MBL/ml de matriz cargada, más de 46 µg MBL/ml de matriz cargada, más de 48 µg MBL/ml de matriz cargada o incluso más de 50 µg MBL/ml de matriz cargada.

Después de lavar la columna de cromatografía de afinidad, se realiza la elución de MBL con un agente desorbente selectivo en un tampón neutro no desnaturante capaz de una elución eficaz de MBL. Este tampón podría ser un tampón Tris con una molaridad en el intervalo de 10-40 mM, preferiblemente 15 mM; y un pH de 7,0-8,0, preferiblemente 7,3, con un contenido de NaCl que varía de 100-250 mM, preferiblemente 100 mM. El agente desorbente podría ser un sacárido tal como N-acetilglucosamina, manosa, N-acetilmanosamina o fucosa y/o un agente quelante

## ES 2 272 067 T3

de iones Ca tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Opcionalmente se usa manosa, con una concentración en el intervalo de manosa 20-100 mM, preferiblemente 30 mM.

5 El segundo elemento clave en el presente procedimiento es la realización de la menos una etapa validada de reducción de virus.

10 Cuando se analizan etapas de reducción de virus, se entiende que una etapa de reducción de virus puede ser una etapa de retirada de virus y/o una etapa de inactivación de virus. Pueden incluirse en el presente procedimiento más de una (por ejemplo, dos) etapas de retirada de virus y/o etapas de inactivación de virus.

15 El propósito de validar una etapa de producción como una etapa de reducción de virus es proporcionar evidencias de que el procedimiento de producción inactivará/retirá eficazmente los virus que se sabe que contaminan los materiales de partida, o que podrían posiblemente hacerlo. Los estudios de validación implican la adición deliberada de un virus antes de las etapas de producción que se tienen que validar y medir el grado de su retirada/inactivación después de la etapa o las etapas de producción. La restricción de GMP evita la introducción deliberada de cualquier virus en las instalaciones de producción.

20 Por lo tanto, la validación debe realizarse en un laboratorio diferente equipado para trabajo virológico en una versión a escala menor de la etapa de producción y debe realizarse por personal con experiencia virológica junto con los ingenieros de producción. La cantidad de virus añadido al material de partida para la etapa de producción que se tiene que validar debe ser lo más elevada posible para determinar la capacidad de la etapa de producción de inactivar/retirar adecuadamente los virus. Sin embargo, la adición de virus se añade de tal forma que la composición de los materiales de producción no se altera significativamente. Preferiblemente, el volumen de la adición de virus será igual o menor del 10%.

25 Los ensayos cuantitativos de infectividad deben realizarse de acuerdo con los principios de GLP y pueden implicar formación de placas, detección de otros efectos citopáticos tales como formación de sincitios o focos, valoración de punto final (por ejemplo, ensayos de TCID<sub>50</sub>), detección de síntesis de antígenos virales u otros procedimientos. El procedimiento debe tener una sensibilidad y reproducibilidad adecuadas y debe realizarse con suficientes réplicas y controles para asegurar la exactitud estadística adecuada de los resultados.

30 Típicamente, una etapa de procedimiento se intenta con 6 log de virus, y si se consigue una reducción del orden de 4 log o más, es indicativo de un efecto claro con el virus de ensayo particular en investigación. De forma similar, una reducción del orden de 4,5 log, 5 log o incluso 5,5 log, es indicativo de un efecto claro con el virus de ensayo particular en investigación, y la etapa se puede clasificar como una etapa validada de reducción de virus.

40 Los estudios de validación de virus se deben realizar con virus parecidos a aquellos que pueden contaminar el producto, tanto como sea posible, y en segundo lugar que representen un intervalo de propiedades físico-químicas tan amplio como sea posible para ensayar la capacidad del sistema de eliminar virus en general.

45 Los estudios de validación han mostrado que la presente etapa de cromatografía de afinidad funciona como etapa de retirada para virus sin envuelta y se esperará que también retire virus con envuelta por un procedimiento de reparto. Por esto, la cromatografía de afinidad constituye una primera etapa de reducción de virus en el presente procedimiento (véase el ejemplo 4).

50 En una realización preferida, la etapa validada de reducción de virus es una etapa de inactivación de virus. Los virus con envuelta infecciosos se inactivan preferiblemente por la adición de una cantidad viricida de agente de inactivación de virus al eluido que contiene MBL recuperado de la etapa de cromatografía de afinidad. Una "cantidad viricida" de agente de inactivación de virus se pretende que indique una cantidad que da lugar a una solución en la que las partículas de virus se vuelven sustancialmente no infecciosas, y por esto se obtiene una solución que contiene MBL a salvo de virus. Tal "cantidad viricida" dependerá del agente de inactivación de virus empleado, así como de las condiciones tales como tiempo de incubación, pH, temperatura, contenido en lípidos y concentración de proteína.

55 La expresión "agente de inactivación de virus" se pretende que indique tal agente o un procedimiento que se puede usar para inactivar virus con envuelta así como virus sin envuelta. La expresión "agente de inactivación de virus" se debe entender como que abarca tanto una combinación de tales agentes y/o otros procedimientos, siempre que sea apropiado, como solamente un tipo de tal agente o procedimiento.

60 Los agentes de inactivación de virus preferidos son detergentes y/o disolventes, mucho más preferiblemente mezclas de detergentes-disolventes. Se debe entender que el agente de inactivación de virus es opcionalmente una mezcla de uno o más detergentes con uno o más disolventes. El tratamiento con detergente/disolvente (S/D) es una etapa ampliamente usada para inactivar virus con envuelta (por ejemplo, VIH1 y VIH2, hepatitis tipo C y no A-B-C, HTLV1 y HTLV2, la familia de herpes virus, incluyendo CMV y virus de Epstein Barr) en productos derivados del plasma. Se puede usar una amplia diversidad 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 para que sea sustancialmente no desnaturalizante. Preferiblemente, se usa un detergente no iónico ya que facilita la eliminación del detergente de la preparación de MBL en la etapa posterior. Se describen detergentes adecuados, por ejemplo por Shanbrom y col., en la Patente de Estados Unidos 4.314.997, y la Patente de Estados Unidos 4.315.919. Los detergentes preferidos son

aquellos comercializados con los nombres de marca Triton X-100 y Tween 80 que se pueden usar solos o en combinación. Los disolventes preferidos para su uso en agentes de inactivación de virus son di o trialquilfosfatos como se describe, por ejemplo, por Neurath y Horowitz en la Patente de Estados Unidos 4.764.369. Un disolvente preferido es el tri(*n*-butil)fosfato (TNBP). Un agente de inactivación de virus especialmente preferido para la práctica de la presente invención es una mezcla de TNBP y Tween 80 pero, como alternativa, se pueden usar otras combinaciones. La mezcla preferida se añade en un volumen tal que la concentración de TNBP en la solución esté en el intervalo del 0,2-1,0% en peso, preferiblemente a una concentración de aproximadamente el 0,3% en peso. La concentración de Tween 80 en la solución está en el 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 realiza en condiciones de inactivación de virus con envuelta produciendo una solución que contiene MBL sustancialmente a salvo de virus. En general, tales condiciones incluyen una temperatura de 4-30°C, tal como 19-28°C, 23-17°C, preferiblemente de aproximadamente 25°C, y un tiempo de incubación que se ha descubierto que es eficaz en estudios de validación. Generalmente, es suficiente un tiempo de incubación de 1-24 horas, preferiblemente 4-12 horas, tal como aproximadamente 6 horas para asegurar la suficiente inactivación de virus. Sin embargo, las condiciones apropiadas (temperatura y tiempo de incubación) dependen del agente de inactivación de virus empleado, del pH y de la concentración de proteínas y contenido en lípidos de la solución.

Los estudios de validación del presente tratamiento con S/D se presentan en el ejemplo 4.

Se contempla que también se pueden emplear otros procedimientos para retirar o inactivar virus para producir un producto MBL a salvo de virus, tal como la adición de azul de metileno con inactivación posterior por radiación con luz ultravioleta.

En un aspecto de la invención, la cromatografía de afinidad es una etapa validada de reducción de virus de tal forma que los dos elementos clave se realicen como uno solo.

El procedimiento preferido para la producción de MBL a partir de una fracción de proteínas plasmáticas que contiene MBL bruta contiene las etapas resumidas a continuación:

Etapa a) preparar una suspensión acuosa de la fracción de proteínas que contiene MBL bruta a pH ácido y temperatura sustancialmente no desnaturizante,

Etapa b) eliminar la mayoría de las inmunoglobulinas de la suspensión de la etapa a) y recuperar una fracción de proteínas que contiene MBL,

Etapa c) solubilizar la fracción que contiene MBL de la etapa b, extraer MBL a un pH neutro, y recuperar una solución que contenga MBL,

Etapa d) añadir una mezcla de un disolvente y un detergente a la solución que contiene MBL de la etapa c),

Etapa e) aplicar dicha solución que contiene MBL de la etapa d) a una matriz basada en polisacáridos reticulada no conjugada en condiciones que promueven la unión de la MBL a la matriz,

Etapa f) eliminar los contaminantes proteicos de dicha matriz basada en polisacáridos de la etapa e) con un tampón no desnaturizante y/o tampones que tienen una composición, pH, y fuerza iónica que provocan la eliminación de la proporción principal de los contaminantes proteicos sin elución sustancial de la MBL,

Etapa g) eluir MBL de la matriz basada en polisacáridos de la etapa e) con un agente desorbente selectivo en un tampón neutro no desnaturizante con una elución eficaz de MBL, que produce un eluido que contiene MBL,

Etapa h) añadir una cantidad viricida de un agente de inactivación de virus no desnaturizante al eluido que contiene MBL de la etapa g) produciendo una solución que contiene MBL sustancialmente a salvo de virus,

Etapa i) aplicar la solución que contiene MBL de la etapa h) sobre una matriz de intercambio aniónico en condiciones por las que MBL se une a la matriz,

Etapa j) lavar la matriz de intercambio aniónico de la etapa i) con un tampón que tiene una fuerza iónica y pH suficientes para eliminar el agente de inactivación de virus de la matriz sin causar una elución sustancial de MBL,

Etapa k) eluir MBL de la matriz de intercambio aniónico de la etapa i) con un tampón sustancialmente no desnaturizante que tiene una fuerza iónica y un pH suficientes para causar la elución eficaz de la MBL, que produce un eluido que contiene MBL;

Etapa J) someter la fracción de eluido que contiene MBL de la etapa k) a ultrafiltración recuperando un concentrado que contiene MBL,

## ES 2 272 067 T3

Etapa m) someter dicho concentrado que contienen MBL de la etapa para obtener cromatografía de filtración, recuperando una solución que contiene MBL de proteínas MBL oligoméricas funcionalmente activas, en un tampón fisiológico no desnaturizante.

5 Las etapas a)-c) son las etapas de preprocesado del procedimiento para purificar MBL de una fracción de proteínas plasmáticas bruta. Las etapas e)-g) y la etapa h) se han descrito anteriormente como los elementos clave del procedimiento de la presente invención.

10 Etapa a) Por tanto, la primera etapa del presente procedimiento para la producción de MBL de plasma es la preparación de una suspensión acuosa de la fracción de Cohn precipitada, con una eliminación posterior de la mayoría de las inmunoglobulinas de dicha suspensión, recuperando de este modo una fracción de proteínas que contiene MBL sustancialmente libre de inmunoglobulinas. Se prefiere que la fracción de Cohn precipitada se suspenda en agua y/tampón a una temperatura y pH sustancialmente no desnaturizantes. La expresión "sustancialmente no desnaturizante" significa que la condición a la que se refiere la expresión no produce una pérdida irreversible sustancial de la actividad funcional de MBL ni de las inmunoglobulinas presentes. De forma ventajosa, la fracción de proteínas plasmáticas se suspende en agua acidificada con al menos un sistema de tampón no desnaturizante a volúmenes de 6 a 9, preferiblemente de 7 a 8 veces de la fracción de proteínas plasmáticas. El pH de la suspensión se mantiene preferiblemente a un pH por debajo de 6, tal como en el intervalo de 4,0-6,0, preferiblemente 5,1-5,7, mucho más preferiblemente aproximadamente 5,4. Se puede usar cualquier tampón ácido adecuado, pero el sistema de tampón preferiblemente contiene la menos uno de los siguientes tampones y ácidos: fosfato sódico, acetato sódico, ácido acético, HCl. Los especialistas en la técnica apreciarán que se pueden usar muchos tampones diferentes. La suspensión de proteínas se mantiene preferiblemente a una temperatura fría, *inter alia* para evitar la desnaturización sustancial de proteínas y para minimizar la actividad proteasa. La suspensión de proteínas plasmáticas y agua así como el sistema de tampón añadido preferiblemente tienen la misma temperatura, en el intervalo de 0-12°C, preferiblemente 0-8°C, mucho más preferiblemente 1-4°C.

30 Etapa b) El material proteico no solubilizado que contiene MBL, llamado "pasta residual", se aísla mediante filtración profunda o por centrifugación. Preferiblemente, la suspensión de la invención se filtra. La filtración preferiblemente se realiza a través de filtros profundos, por ejemplo C150 AF, AF 2000 o AF 1000 (Schenk) o filtros similares. La mayoría de las inmunoglobulinas en la suspensión se eliminan mediante dicha filtración.

35 Etapa c) Se extrae MBL posteriormente de la pasta residual en condiciones neutras, preferiblemente a una temperatura de 1-8°C, después de la adición de un tampón esencialmente no desnaturizante. El tampón para la extracción es preferiblemente una solución salina tamponada con Tris (TBS), con una concentración de Tris de 10-40 mM, preferiblemente 10 mM, con un pH de 7,5-9,0, preferiblemente 8,5, y una concentración de NaCl de 100-200 mM, preferiblemente 140 mM. Los especialistas en la técnica apreciarán que se pueden usar otros tampones no desnaturizantes para extraer MBL. La solución que contiene MBL obtenida por extracción se recupera por filtración a través de una serie de filtros profundos con tamaños de poro decrecientes y un filtro de deslipidación, preferiblemente como se describe en el Ejemplo 1. Esta solución que contiene MBL se puede concentrar de forma ventajosa mediante ultrafiltración antes de la etapa de cromatografía de afinidad.

45 Etapa d) Antes de aplicar la solución que contiene MBL a la columna de afinidad, se añade preferiblemente una mezcla de disolvente y detergente tal como Tween 80 y/o Triton X-100 al 0,8-1,5% y TNBP al 0,2-1,0%, a la solución, más preferiblemente TNBP al 0,3% y Tween 80 al 1,0%, para reducir el contenido de lipoproteínas en la solución que contiene MBL eluida en la etapa subsiguiente de cromatografía de afinidad. Como consecuencia del elevado contenido de lípidos y lipoproteínas en la solución, este tratamiento con disolvente/detergente no constituirá una etapa de inactivación de virus en la técnica. Sin embargo, se esperará que se inactive una elevada proporción de virus con envuelta por dicho tratamiento.

50 Etapa i) Cuando se realiza la etapa de cromatografía de intercambio iónico para la purificación de MBL, se prefiere que las condiciones, por ejemplo el pH y la fuerza iónica, se elijan de forma que sustancialmente toda la MBL presente en la solución aplicada a la matriz de intercambio aniónico se una a la matriz. El agente o agentes de inactivación de virus se retiran en el lavado posterior de la matriz de intercambio aniónico.

55 Como sabrán bien los especialistas en la técnica, los intercambiadores iónicos se pueden basar en diversos materiales con respecto a la matriz así como a los grupos cargados unidos. Por ejemplo, se pueden usar las siguientes matrices, en las que los materiales mencionados pueden estar más o menos reticulados: basados en agarosa (tales como Sepharose CL-6B<sup>®</sup>, Sepharose Fast Flow<sup>®</sup> y Sepharose High Performance<sup>®</sup>), basados en celulosa (tales como DEAE Sephacel<sup>®</sup>), basados en dextrano (tales como Sephadex<sup>®</sup>), basados en sílice y basados en polímero sintético. Para la matriz de intercambio aniónico, los grupos cargados que se unen covalentemente a la matriz pueden ser por ejemplo dietilaminoetil (DEAE), aminoetil cuaternario (QAE), y/o amonio cuaternario (Q). Se pueden usar otros intercambiadores aniónicos.

65 Si, por ejemplo, la matriz de intercambio aniónico elegida es Q Sepharose FF<sup>®</sup>, entonces la columna se equilibra de forma ventajosa con un tampón alcalino no desnaturizante que tenga aproximadamente el mismo pH y fuerza iónica que la solución de MBL que se tiene que cargar. Cualquiera de una diversidad de tampones es adecuado para el equilibrado de las columnas de intercambio iónico, por ejemplo, fosfato sódico, tris(hidroximetil)amino-metano. Los especialistas en la técnica apreciarán que se pueden usar numerosos tampones diferentes para el equilibrado siempre

## ES 2 272 067 T3

que el pH y la conductividad sean aproximadamente las mismas que para la solución MBL aplicada. Un tampón preferido para el equilibrado de la columna de intercambio aniónico es un tampón Tris que tiene una concentración Tris en el intervalo de 10-40 mM, tal como en el intervalo de 20-30 mM, preferiblemente aproximadamente 15 mM. Se prefiere que el pH del tampón Tris usado para el equilibrado esté en el intervalo de 7,0 a 9,0, tal como en el intervalo de 7,5-8,5, preferiblemente aproximadamente 8,0. El tampón usado preferiblemente contiene una concentración de NaCl en el intervalo de 10-40 mM, tal como 20-30 mM, preferiblemente NaCl 25 mM.

Etapa j) El lavado inicial se realiza de forma ventajosa usando el tampón de equilibrado, aunque se pueden usar otros tampones con una concentración y valor de pH similares para el lavado. El lavado se realiza con un volumen de 10-20 veces el del volumen de la columna.

Etapa k) La elución de la MBL de la matriz de intercambio aniónico se realiza preferiblemente con un tampón sustancialmente no desnaturizante que tiene un pH y una fuerza iónica suficientes para producir la elución eficaz de la MBL, recuperando de este modo un eluido que contiene MBL. En este contexto, la elución eficaz significa que al menos el 80%, tal como al menos el 90%, por ejemplo al menos el 95% de las proteínas MBL se cargan en la matriz de intercambio aniónico. La elución se realiza de forma ventajosa con un tampón Tris que contiene Tris 5-25 mM, tal como 10-30 mM, preferiblemente 15 mM y NaCl 0,1-1,0 M, tal como 0,3-0,7 M, preferiblemente 0,5 M con un pH en el intervalo de 6,0-9,0, tal como 7,0-8,0, preferiblemente 7,4.

Se prefiere que la concentración salina del tampón de elución sea lo suficientemente elevada para desplazar la MBL de la matriz. Sin embargo, se contempla que se puede usar un descenso en el pH y una concentración salina menor para eluir la MBL de la matriz.

Etapa l) Posteriormente a la elución de la columna de intercambio aniónico, el eluido preferiblemente se concentra. Las membranas empleadas para la ultrafiltración tienen de forma ventajosa un límite de peso nominal en el intervalo de 10.000-100.000 Da. Un tipo preferido de membrana para el presente procedimiento es una membrana con un límite de peso nominal de 10.000 Da, obtenida de Sartorius. Se pueden emplear otras membranas de ultrafiltración de porosidad comparable.

Etapa m) La última etapa de cromatografía del procedimiento, la etapa de filtración en gel, se puede considerar como una etapa de pulido, por la que se eliminan SAP, IgG, agregados de proteínas y MBL estructuralmente alterada, que se puede haber formado durante las etapas posteriores a la cromatografía de afinidad.

El procedimiento preferido para la producción de MBL a partir de una suspensión o sobrenadante de células lisadas que contiene MBL comprende al menos la etapa de preprocesado para filtrar la suspensión o sobrenadante de células lisadas que contiene MBL para aclarar la solución y retirar, por ejemplo, desechos celulares.

Después de esta etapa de preprocesado por la que se obtiene una solución que contiene MBL, se realizan las etapas e)-m) como se ha descrito anteriormente. En otra realización, el procedimiento para la producción de MBL a partir de una suspensión o sobrenadante de células lisadas que contiene MBL comprende la etapa de preprocesado y las etapas e)-m).

El procedimiento preferido para la producción de MBL a partir de un producto de leche o calostro que contiene MBL contiene las siguientes etapas de preprocesado:

Etapa 1) añadir un precipitante de proteínas soluble en agua, sustancialmente no desnaturizante, al producto de leche o calostro que contiene MBL en una cantidad suficiente para producir la precipitación de una alta proporción de componentes no MBL, sin producir la precipitación sustancial de MBL, o la precipitación de la mayoría de la MBL sin producir una precipitación sustancial de los componentes no MBL; formando de este modo una mezcla de un precipitado sólido y un sobrenadante líquido.

Etapa 2) recuperar un sobrenadante que contiene MBL aclarado de dicha mezcla de la etapa 1) o un precipitado que contiene MBL resuspendido aclarado de dicha mezcla de la etapa 1).

Etapa 1) Los precipitantes de proteínas solubles en agua, sustancialmente no desnaturizantes, son bien conocidos en el campo de la purificación de proteínas. Tales precipitantes se usan para el fraccionamiento de proteínas, provocando una purificación parcial de proteínas de suspensiones. Los precipitantes de proteínas adecuados para su uso en el procedimiento de la presente invención incluyen formas de diversos pesos moleculares de PEG, ácido caprílico y sulfato amónico. Los especialistas en la técnica apreciarán que se pueden usar varios precipitantes solubles en agua no desnaturizantes diferentes como medios alternativos para la precipitación. La expresión “añadir un precipitante de proteínas” y variantes de la expresión implican la adición de uno o más tipos de agentes precipitantes de proteínas.

Etapa 2) Después de la finalización de la precipitación de proteínas, se recupera un sobrenadante o solución que contiene MBL del precipitado resuspendido. La primera parte de la recuperación se realiza por técnicas convencionales de separación de líquidos de una fase sólida, tales como centrifugación y/o filtración. Preferiblemente, se usa una centrifuga de flujo continuo con una fuerza de 1000-5000 g. En otra realización, la primera parte de la recuperación se realiza por una filtración profunda en una prensa de filtro. De este modo se recupera el sobrenadante que contiene MBL.

## ES 2 272 067 T3

El precipitado que contiene la mayoría de la MBL obtenida por la primera parte de la recuperación se resuspende por adición de un tampón neutro no desnaturizante.

5 Opcionalmente, el sobrenadante que contiene MBL recuperado o el precipitado resuspendido se somete a filtración profunda para retirar partículas y agregados más grandes. Esto viene seguido opcionalmente por una filtración a esterilidad realizada por el uso de un filtro de esterilización convencional (tal como un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  de Millipore o Sartorius), que elimina por ejemplo bacterias de la solución.

10 Después de las etapas 1) y 2) de preprocesado por las que se obtiene una solución que contiene MBL, el procedimiento preferido para la producción de MBL a partir de un producto de leche o calostro que contiene MBL transcurre con las etapas d)-m) como se ha descrito anteriormente.

15 El procedimiento de la invención se optimiza para obtener una alta producción de MBL con una pureza elevada (véase el Ejemplo 3). El rendimiento del procedimiento de la presente invención se calcula como el porcentaje de la cantidad de MBL en el producto final en relación a la cantidad media de MBL en la solución que contiene MBL aplicada a la columna de cromatografía de afinidad. Este rendimiento es más del 40%, que se considera que es satisfactorio, especialmente con la pureza concomitante de la preparación final de MBL antes de la formulación, constituyendo la MBL aproximadamente el 60% de las proteínas totales. Con otro material de partida también pueden ser aceptables 20 rendimientos menores. Preferiblemente el rendimiento es al menos el 20%, tal como el 25%, 30%, 35%, 40% o incluso más del 40%.

25 Los procedimientos de la técnica anterior que se han descrito en la sección de introducción se han realizado todos a pequeña escala de laboratorio con el propósito de obtener MBL para investigación analítica, es decir, empleando hasta aproximadamente 1 litro de plasma como material de partida. La presente invención pretende producir lectina de unión a manano a gran escala de producción. Una "gran escala de producción" es cuando el material de partida es una fracción de proteínas plasmáticas bruta, entendiéndose que el material de partida preferiblemente es una combinación de plasma de más de no menos de 1.000 donantes. Otro concepto más general de "gran escala de producción" es una capacidad de unión de la columna en la primera etapa clave de más de que 20  $\mu\text{g}$  MBL/ml de matriz cargada, por ejemplo más de 25  $\mu\text{g}$  MBL/ml de matriz cargada, tal como más de 30  $\mu\text{g}$  MBL/ml de matriz cargada, más de 35  $\mu\text{g}$  MBL/ml de matriz cargada, más de 40  $\mu\text{g}$  MBL/ml de matriz cargada, más de 42  $\mu\text{g}$  MBL/ml de matriz cargada, más de 44  $\mu\text{g}$  MBL/ml de matriz cargada, más de 46  $\mu\text{g}$  MBL/ml de matriz cargada, más de 48  $\mu\text{g}$  MBL/ml de matriz cargada o incluso más de 50  $\mu\text{g}$  MBL/ml de matriz cargada.

35 El procedimiento de la presente invención además pretende purificar MBL de un sobrenadante de cultivo celular, de una suspensión de células lisadas, de un producto de lecho o de calostro para posterior uso del producto de MBL como un producto medicinal en seres humanos. Por lo tanto, el procedimiento de fabricación tiene que cumplir los requisitos establecidos en Directives and guidelines de la CEE para productos medicinales tales como productos biotecnológicos/biológicos o productos derivados de plasma humano, por ejemplo, Note for guidance on plasma derived medicinal products, CPMP/BWP/269/95 o directrices similares.

40 Estos requisitos incluyen, pero sin limitación, el uso de agentes químicos en el procedimiento de purificación así como en el producto final. En el presente procedimiento se purifica MBL sin la adición de inhibidores de proteasa, tales como PMSF, o agentes bacteriostáticos, tales como azida y mertiolato. El producto está de este modo totalmente libre de inhibidores de proteasa y de agentes bacteriostáticos añadidos.

45 El producto de MBL se fabrica de acuerdo con GMP, en condiciones asépticas en localizaciones clasificadas. Para evitar la degradación proteolítica de las proteínas durante la producción, el procedimiento se realiza principalmente en habitaciones frías. El procedimiento de la invención está diseñado de este modo para producir un producto de MBL para su uso en medicina.

50 El producto de MBL del presente procedimiento de purificación contendrá, a pesar de todos los esfuerzos, otras proteínas diferentes a MBL. Usando plasma humano como material de partida estarán presentes proteínas plasmáticas tales como IgM.

55 Es de enorme importancia para el efecto clínico del producto de MBL que se mantenga la actividad funcional del MBL, es decir, que el producto esté constituido por MBL oligomérica funcionalmente activa. En este contexto se define una MBL funcionalmente activa como una MBL capaz de a) unirse a carbohidratos en la superficie de los microorganismos (por ejemplo, manano de levaduras), b) capacidad de facilitar la fagocitosis de microorganismos unidos a la MBL a través de la interacción con receptores de colectina sobre células fagocíticas, y c) su capacidad de activar el complemento como consecuencia de la unión, por ejemplo, a la superficie de microorganismos. Esta activación del complemento parece que sucede mediante las serín proteasas asociadas a MBL MASP 1 y 2, y provoca funciones efectoras del complemento como reacciones inflamatorias, opsonización y reacciones citolíticas.

60 La actividad funcional de MBL se puede demostrar *in vitro* por la unión de MBL a manano en placas de ELISA revestidas de manano, un ensayo fagocítico en el que se ingieren partículas de zymosan revestidas de MBL por células fagocíticas de sangre periférica, y por la activación del complemento visualizada por la deposición de factores del complemento (por ejemplo, C3 o C4) después de la unión de MBL a carbohidratos en un ensayo de tipo ELISA. Para estabilizar las proteínas MBL durante el almacenamiento, el producto se formula añadiendo al menos un agente

de estabilización de proteínas. Los agentes de estabilización de proteínas son conocidos para los especialistas en la técnica, e incluyen diferentes alcoholes de azúcar y sacáridos (tales como sorbitol, glucosa, sacarosa, trehalosa, maltosa), proteínas (tales como albúmina), y aminoácidos (tales como lisina, glicina). En la presente invención se prefiere la albúmina como un estabilizador de proteínas, preferiblemente a una concentración del 0,1-1% en peso, tal como del 0,5% en peso.

El producto de MBL se formula como un producto líquido para administración intravenosa. Un aspecto importante del procedimiento de la presente invención es que la MBL purificada llega a estar altamente concentrada. Es por tanto posible obtener un producto con una concentración de al menos 250  $\mu\text{g}$  de MBL por ml. La elevada concentración de MBL aumenta la estabilidad del producto líquido. El producto de MBL también se puede liofilizar para aumentar la estabilidad en el tiempo. La concentración del producto liofilizado se calcula siguiendo las directrices dadas por el fabricante para la reconstitución del producto liofilizado.

Las indicaciones principales para el producto de MBL son la deficiencia de MBL congénita y adquirida. Además el producto de MBL tiene las siguientes indicaciones:

Neurología: Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), Neuropatía motora multifocal, Esclerosis múltiple, Miastenia Gravis, Síndrome de Eaton-Lambert, Neuritis óptica, Epilepsia;

Ginecología: Aborto habitual, Síndrome anti-fosfolípidos primario;

Reumatología: Artritis reumatoide, Lupus sistémico eritematoso, Escleroderma sistémica, Vasculitis, Granulomatosis de Wegner, Síndrome de Sjogren, Artritis reumatoide juvenil;

Hematología: Neutropenia autoinmune, Anemia hemolítica autoinmune, Neutropenia;

Gastrointestinal: Enfermedad de Crohn, Colitis ulcerosa, Enfermedad celíaca,

Otras: Asma, síndrome de shock séptico, Síndrome de fatiga crónica, Psoriasis, Síndrome de shock tóxico, Diabetes, Sinusitis, Cardiomiopatía dilatada, Endocarditis, Aterosclerosis, Adultos con SIDA e infecciones bacterianas, Hipo/agammaglobulinemia primaria incluyendo inmunodeficiencia variable común, Síndrome de Wiskot-Aldrich e Inmunodeficiencia combinada grave (SCID), Hipo/agammaglobulinemia secundaria en pacientes con leucemia linfática crónica (CLL) y mieloma múltiple, Niños con SIDA e infecciones bacterianas, Púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) aguda y crónica, Transplante de médula ósea (BMT) alogénica, Enfermedad de Kawasaki, y Síndrome de Guillian-Barre.

## Ejemplos

Se debe entender que los ejemplos descritos a continuación son ilustrativos de realizaciones del presente procedimiento, y que la invención no se pretende limitar de ese modo.

### Ejemplo 1

*Etapas del procedimiento en la purificación de MBL derivada de plasma para su uso como producto medicinal*

Todas las etapas se realizan a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ , excepto para la etapa 5 que se realiza a  $25^\circ\text{C}$ , y las etapas 7 y 8 que se realizan a temperatura ambiente.

#### Etapas 1

*Preparación de la pasta de fracción de Cohn II + III*

La pasta de las fracciones de Cohn II + III se prepara a partir de plasma humano mediante un procedimiento de fraccionamiento de Cohn convencional (12) esencialmente modificado por Kistler-Nitschmann (13). La precipitación con etanol se inicia después de que se haya retirado el crioprecipitado y, si se desea, después de la adsorción de ciertas proteínas plasmáticas (tales como Factor IX y Antitrombina) por ejemplo a una matriz de material de intercambio iónico y/o Sepharose Heparina. Las condiciones de la extracción (pH, concentración de etanol, temperatura, concentración de proteínas) para obtener la pasta de la fracción II + III aparecen en la figura de la página 266 en Harns JR (ed), Blood Separation and Plasma Fractionation, Wiley-Liss, Nueva York, 1991. La pasta se aísla en una prensa de filtro añadiendo coadyuvante de filtración antes de la filtración.

#### Etapas 2

*Extracción de inmunoglobulinas de la pasta de fracciones de Cohn II + III*

Se logra la extracción de 140 kg de pasta de fracción II + III incluyendo 30 kg de coadyuvante de filtración (Schenk, Alemania) que corresponde a un volumen de plasma de partida de aproximadamente 1150 kg, añadiendo primero 525 kg de tampón fosfato/acetato sódico 2,3 mM, pH 4,0, con agitación lenta durante aproximadamente 1,5 horas, seguido

## ES 2 272 067 T3

por 2 adiciones consecutivas de 350 kg de agua para inyección (WFI), con agitación durante aproximadamente 1,5 horas después de cada adición. Finalmente, se añaden aproximadamente 280 kg de fosfato/acetato sódico 21,5 mM, pH 7,0, ajustando de este modo la suspensión a un pH final de 5,4. La suspensión se filtra a través de un filtro profundo (C-150AF, Schenk, Alemania). El filtrado contiene entre otras proteínas, las inmunoglobulinas, mientras que la MBL permanece en la pasta residual recuperada.

### Etapa 3

#### *Preparación de una solución que contiene MBL*

Se añade solución salina tamponada con Tris, TBS (Tris 10 mM, NaCl 140 mM), pH 8,4 a la pasta residual que contiene MBL (que constituye aproximadamente 80 kg incluyendo el coadyuvante de filtración) en una cantidad equivalente a 3 kg por kg de pasta residual. La suspensión se agita durante aproximadamente 16 horas para extraer MBL. La suspensión se filtra a través de una serie de filtros profundos con tamaños de poros decrecientes y un filtro de deslipidación: placas de filtro C-150-AF y AF-1000 (Schenk, Alemania), y cartuchos de 50LA, de 90LA, y de filtros de deslipidación (Cuno, Francia). La solución filtrada que contiene MBL se ultrafiltra en un sistema que emplea membranas con un valor límite de peso nominal de 300 kDa (Sartorius, Alemania), por la que la solución se concentra aproximadamente 10 veces. La solución concentrada que contiene MBL se filtra finalmente a través de un cartucho de filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Pall SLK 7002 NLZP, UK). Se añaden Tri-n-butilfosfato (TNBP) y Tween 80 a la solución final a concentraciones del 0,3% y el 1,0% en peso, respectivamente. Esta mezcla se agita durante 3,5 horas. Posteriormente, se añade  $\text{CaCl}_2$  a una concentración de 5 mM seguido por la adición de un volumen igual de TBS que contiene  $\text{CaCl}_2$  5 mM, pH 7,3.

### Etapa 4

#### *Cromatografía de afinidad en Sepharose CL4B*

Se llena una columna con 10 litros de Sepharose CL4B<sup>®</sup> (PharmaciaBiotech, Suecia), y se equilibra con TBS que contiene  $\text{CaCl}_2$  5 mM (Tris 10 mM, NaCl 145 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM), pH 7,3. La solución que contiene MBL se aplica a la columna. Después de la aplicación, la columna se lava sucesivamente con 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado y 6 volúmenes de columna de TBS que contiene  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM (Tris 10 mM, NaCl 200 mM,  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM), pH 7,3. La MBL se eluye de la columna de afinidad con TBS que contiene manosa (Tris 15 mM, NaCl 100 mM, manosa 30 mM), y se recupera la fracción de MBL eluida.

### Etapa 5

#### *Tratamiento con S/D*

La concentración de manosa de la fracción de MBL eluida se ajusta a aproximadamente 10 g/kg añadiendo 4,6 kg de manosa por kg de eluido, después se realiza una filtración a través de un filtro combinado de 0,45  $\mu\text{m}$  y 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartobran P Capsule, Sartorius, Alemania). El filtrado se trata posteriormente con S/D añadiendo Tween 80 y TNBP a concentraciones finales del 1,0% y el 3,0% en peso, respectivamente. El tratamiento con S/D transcurre durante al menos 6 horas a 25°C.

### Etapa 6

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

Se llena una columna con 600 ml de Q Sepharose FF<sup>®</sup> (Pharmacia Biotech, Suecia), y se equilibra con Tris 15 mM que contiene NaCl 25 mM, pH 8,0. La solución de MBL tratada con S/D se diluye con un volumen de Tris 15 mM, pH 8,0, 3 veces el de la solución. La solución de MBL diluida se aplica a la columna de intercambio aniónico, la columna se lava posteriormente con 10 volúmenes de columna de tampón de equilibrado, y se eluye MBL con Tris 15 mM que contiene NaCl 0,5 mM, pH 7,4.

### Etapa 7

#### *Concentración por ultrafiltración*

La fracción de MBL eluida se diluye añadiendo 2 volúmenes de Tris 15 mM, pH 7,1, y se somete a concentración por ultrafiltración empleando un Sartocoon Micro UF System (Sartorius, Alemania) con una membrana de límite de peso nominal de 100 kDa. La solución concentrada que contiene 5 a 7 mg de MBU/ml se filtra a través de un filtro combinado de 0,45 y 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartobran 300 Sartorius, Alemania), y se ajusta a EDTA 3 mM añadiendo EDTA sólido.

## ES 2 272 067 T3

### Etapa 8

#### *Filtración en gel de Superose 6*

5 Se llena una columna con 4 litros de Superose 6 prep grade (Pharmacia Biotech, Suecia) y se equilibra con PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,4 mM, NaCl 145 mM), pH 7,3. El concentrado de MBL concentrado y ajustado con EDTA se aplica a la columna, y se realiza la filtración en gel con PBS como tampón. La fracción de MBL final eluye como el primer pico principal de la columna y se recoge.

### 10 Etapa 9

#### *Formulación de la MBL como un producto medicinal líquido*

15 La fracción de MBL final es una solución de MBL en un tampón fisiológico (PBS, pH 7,3) con una concentración que varía de 300 a 400  $\mu\text{g}$  de MBL por ml. Se añade a esta solución de MBL la albúmina estabilizadora de proteínas como una solución nanofiltrada (a través de un filtro de 15 nm) a una concentración del 0,5% (p/v). La preparación de MBL estabilizada por albúmina final se filtra a esterilidad (Sartobran 300, Sartorius), y se carga asépticamente como 3 mg de MBL por parte en un volumen de no más de 10 ml.

### 20 Ejemplo 2

#### *Procedimiento analítico para cuantificar MBL en el procedimiento*

##### *Determinación cuantitativa de MBL por un ELISA específico*

25 La MBL se cuantifica en un ELISA tipo sándwich específico de MBL. Se usa un anticuerpo monoclonal de ratón anti-MBL para atrapar y también para detectar la MBL. En este ensayo, el anticuerpo de detección está biotinilado. Después de la unión a los anticuerpos biotinilados, la HRP conjugada con estreptavidina convierte el reactivo colorante OPD de una manera dependiente de la concentración. La concentración de las muestras analizadas se estima por el uso de un patrón de suero de MBL.

### Ejemplo 3

#### *Rendimiento del procedimiento de purificación*

35 El volumen de la solución que contiene MBL preparada a partir de 80 kg de pasta residual hace un total de aproximadamente 360 kg, con una concentración de aproximadamente 1,7 mg de MBL por litro. La solución que contiene MBL se concentra aproximadamente 10 veces por ultrafiltración empleando una membrana con un límite de peso nominal de 300 kDa para tener un volumen más fácil de manejar en el posterior procedimiento de purificación y para eliminar una parte de las proteínas con menor peso molecular de la solución que contiene MBL. La solución que contiene MBL concentrada final con un volumen medio de 38 kg, contiene aproximadamente 68 g de proteínas totales y tiene una concentración media de 14,6 mg de MBL por litro ( $\rho = 1,011 \text{ kg/l}$ ). La recuperación total del procedimiento de extracción produce aproximadamente 550 mg de MBL, equivalente a 0,48 mg por kg de plasma de partida, 3,9 mg por kg de pasta II y III, y 6,9 mg de MBL por kg de pasta residual.

45 La solución que contiene MBL concentrada constituye el material para las etapas posteriores de purificación del procedimiento comenzando con la etapa de cromatografía de afinidad. El rendimiento del procedimiento de purificación (Ejemplo 1) es de aproximadamente 235 mg de MBL correspondientes a una recuperación de aproximadamente el 43% de la MBL presente en la solución. La pureza de la preparación de MBL final antes de la formulación es elevada, la MBL constituye aproximadamente el 60% del contenido total de proteínas.

### Ejemplo 4

#### *Validación de las etapas de reducción de virus*

55 La etapas de reducción de virus se validaron de acuerdo con la CPMP Note for Guidance on Virus Validation Studies: The Design, Contribution and Interpretation of Studies Validating the Inactivation and Removal of Viruses (CPMP/BWP/268/95) y Note for Guidance on Plasma Derived Medicinal Products (CPMP/BWP/269/95).

#### *Validación de la etapa de tratamiento con S/D*

60 La etapa de tratamiento con S/D del procedimiento de purificación se validó para la inactivación de virus. Para este estudio se seleccionaron tres virus con envuelta, el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la pseudorrabia porcina (PRV). La elección de los virus refleja los virus que pueden contaminar la sangre y/o plasma humano y/o incluye virus modelo de estos virus.

65 Se tomaron muestras de la etapa relevante del procedimiento de producción con los virus de elección y se realizó tratamiento con S/D. Se recogieron las muestras y se cuantificó la cantidad de virus por ensayos en cultivos celulares.

## ES 2 272 067 T3

Después se calcularon los factores de eliminación y reducción de virus. Los resultados del estudio se resumen a continuación:

5	Tratamiento con S/D	BVDV	VIH	PRV
	Factor de eliminación de virus ( $\log_{10}$ )	$\geq 5,7$	$\geq 5,7$	7,0
	Factor de reducción de virus ( $\log_{10}$ )	$\geq 6,9$	$\geq 5,6$	6,3

### 10 *Validación de la etapa de cromatografía de afinidad como una etapa de retirada de virus*

15 El objetivo de este estudio fue determinar la eficacia (expresada como un factor de reducción) de la etapa de cromatografía de afinidad del procedimiento de producción medido como la retirada de CPV (Parvovirus canino) y HAV (Virus de la hepatitis A), respectivamente, dos virus pequeños sin envuelta de alta resistencia físico-química.

20 La eficacia de este procedimiento se calculó por comparación de la cantidad medida de virus inoculada en el material de partida y la recuperación de virus en el material eluido de la columna y expresado como el factor de reducción. Los factores de reducción se resumen a continuación:

20	Etapa de cromatografía de afinidad	CPV	HAV
	Factor de reducción de virus ( $\log_{10}$ )	$3,8 \leq \text{reducción} \leq 7,5$	$3,2 \leq \text{reducción} \leq 6,7$

### 25 **Referencias**

1. M. W. **Turner**, *Immunology Today*, 1996, 17, 532-540
- 30 2. H. J. **Hoppe** y K. B. M. **Reid**, *Protein Sci*, 1994, 3, 1143-1158
3. M. **Matsushita** y col., *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 183, 645-651
4. S. **Thiel** y col., *Nature*, 1997, 386, 506-510
- 35 5. D. C. **Kilpatrick** y col., *Hum Reproduc*, 1995, 10, 2501-2505
6. **Kawasaki**, N, y col., *J Biochem* (Tokio), 1983, 94, 937-947
- 40 7. J. A. **Summerfield** y M. E. **Taylor**, *Biochem Biophys Acta*, 1986, 883, 197-206
8. J. **Lu** y col., *J. Immunol*, 1990, 144, 2287-2294
9. T. **Kawasaki** y col., *Methods Enzymol*, 1989, 179, 310-321
- 45 10. M. **Kyogashima** y col., *Arch Biochem Biophys*, 1990, 283, 217-222
11. S. M. **Tan** y col., *Biochem J.*, 1996, 319, 329-332
- 50 12. E. **Cohn** y col., *J Am Chem Soc*, 1946, 68, 459-475
13. P. **Kistler** y H. S. **Nitschmann**, *Vox Sang.* 1952, 7, 414-424
14. US-A-5 270 199
- 55 15. A. **Kopper** y col., *Journal of chromatography B: medical applications*, 1994, 662, 191-196
16. P. C. **kilPatrick**, *transfusion medicine*, 1997, 7, 289-294.

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para purificar lectina de unión a manano (MBL) que comprende al menos los siguientes elementos:
- realizar una etapa de cromatografía de afinidad en una matriz de polisacáridos reticulada no conjugada;
  - realizar al menos una etapa validada de reducción de virus.
- 10 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el material de partida es un sobrenadante, suspensión, producto de leche, calostro o fracción de proteínas plasmáticas bruta que contiene MBL.
- 15 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el material de partida es un producto de leche que contiene MBL.
- 20 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el material de partida es un sobrenadante que contiene MBL.
- 25 5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el material de partida es una fracción de proteínas plasmáticas bruta.
- 30 6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la fracción de proteínas plasmáticas bruta es una fracción de Cohn.
- 35 7. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las etapas de pre-procesado eliminan la mayoría de las inmunoglobulinas de la suspensión recuperando de este modo una fracción de proteínas que contiene MBL.
- 40 8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tampón o tampones usados para eliminar los contaminantes proteicos de la matriz de cromatografía de afinidad después de la aplicación de la solución que contiene MBL son no desnaturizantes y tienen una composición, pH, y fuerza iónica que provocan la eliminación de la proporción principal de los contaminantes proteicos sin elución sustancial de MBL.
- 45 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que uno de los tampones es un tampón Tris con un contenido de iones Ca de 0,2-2,0 mM.
- 50 10. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la elución de la matriz de cromatografía de afinidad se realiza con un agente desorbente selectivo en un tampón neutro no desnaturizante capaz de una elución eficaz de MBL.
- 55 11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el agente desorbente es un sacárido.
- 60 12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el agente desorbente es un agente quelante de iones Ca.
- 65 13. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de cromatografía de afinidad sirve como etapa de retirada de virus.
14. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de reducción de virus se realiza añadiendo una cantidad viricida de una agente de inactivación de virus no desnaturizante a la solución que contiene MBL produciendo una solución que contiene MBL relativamente a salvo de virus.
15. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el agente de inactivación de virus no desnaturizante es una mezcla de al menos un detergente y al menos un disolvente sustancialmente no desnaturizantes.
16. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la mezcla no desnaturizante de un detergente y un disolvente es de Tween 80 y/o Triton X-100 al 0,8-1,5% y TNBP al 0,2-1,0%.
17. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el rendimiento final de MBL es más del 40% de la cantidad de MBL en la solución que contiene MBL aplicada a la columna de afinidad.
18. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el producto de MBL final se formula añadiendo al menos un estabilizador de proteínas.
19. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que todas las etapas se realizan en condiciones asépticas.

## ES 2 272 067 T3

20. Una formulación farmacéutica de un producto de MBL oligomérico, funcionalmente activo totalmente libre de inhibidores de proteasa sintéticos y/o agentes bacteriostáticos.

21. La formulación de acuerdo con la reivindicación 20, estando dicha formulación a salvo de virus.

22. La formulación de acuerdo con la reivindicación 21, con una concentración de al menos 250  $\mu\text{g}$  de MBL por ml.

23. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, que es un producto de MBL líquido.

24. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20-22, que es un producto de MBL liofilizado.

25. Una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20-24, para su uso en medicina.

26. Uso de una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20-24 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades asociadas con deficiencia de MBL congénita, hereditaria o adquirida en un mamífero.

27. Uso de acuerdo con la reivindicación 26 para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de infecciones.

28. Uso de acuerdo con la reivindicación 26 ó 27, en el que el mamífero es un ser humano.

29. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26-28, en el que las infecciones están asociadas con síntomas funcionales y/o clínicos.

30. Uso de acuerdo con la reivindicación 29, en el que dichos síntomas funcionales o clínicos se seleccionan entre el grupo constituido por Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIPD), Neuropatía motora multifocal, Esclerosis múltiple, Miastenia Gravis, Síndrome de Eaton-Lambert, Neuritis óptica, Epilepsia, Aborto habitual, Síndrome anti-fosfolípidos primario, Artritis reumatoide, Lupus sistémico eritematoso, Escleroderma sistémica, Vasculitis, Granulomatosis de Wegner, Síndrome de Sjogren, Artritis reumatoide juvenil, Neutropenia autoinmune, Anemia hemolítica autoinmune, Neutropenia, Enfermedad de Crohn, Colitis ulcerosa, Enfermedad celíaca; y Asma, Síndrome de shock séptico, Síndrome de fatiga crónica, Psoriasis, Síndrome de shock tóxico, Diabetes, Sinusitis, Cardiomiopatía dilatada, Endocarditis, Aterosclerosis, Adultos con SIDA e infecciones bacterianas, Hipo/agammaglobulinemia primaria incluyendo inmunodeficiencia variable común, Síndrome de Wiskot-Aldrich e inmunodeficiencia combinada grave (SCID), Hipo/agammaglobulinemia secundaria en pacientes con leucemia linfática crónica (CLL) y mieloma múltiple, Niños con SIDA e infecciones bacterianas, Púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) aguda y crónica, Transplante de médula ósea (BMT) alogénica, enfermedad de Kawasaki, y Síndrome de Guillan-Barre.