



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 289**

51 Int. Cl.:
C07K 14/75 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01)
A61K 38/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99947668 .2**
86 Fecha de presentación : **24.09.1999**
87 Número de publicación de la solicitud: **1115745**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.07.2001**

54 Título: **Purificación de fibrinógeno a partir de fluidos mediante precipitación y cromatografía de interacción hidrófoba.**

30 Prioridad: **24.09.1998 GB 9820847**
24.09.1998 GB 9820848
24.09.1998 GB 9820845
07.10.1998 US 103321 P
07.10.1998 US 103319 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73 Titular/es: **Pharming Intellectual Property B.V.**
P.O. Box 451
2300 AL Leiden, NL

72 Inventor/es: **McCreath, Graham y**
Udell, Michael

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 267 289 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

Purificación de fibrinógeno a partir de fluidos mediante precipitación y cromatografía de interacción hidrófoba.

5 Esta descripción se refiere generalmente a la purificación de fibrinógeno a partir de fluidos, en particular, pero no exclusivamente a partir de la leche y específicamente a la purificación de fibrinógeno humano a partir de la leche de animales no humanos transgénicos.

10 El fibrinógeno, la principal proteína estructural en la sangre responsable de la formación de coágulos existe como un dímero de tres cadenas polipeptídicas; la $A\alpha$ (66,5 kD), $B\beta$ (52 kD) y γ (46,5 kD) están unidas a través de 29 enlaces disulfuro. La adición de carbohidratos unidos a asparragina a las cadenas $B\beta$ y γ da como resultado una molécula con un peso molecular de 340 kD. El fibrinógeno tiene una estructura trinodal, un nódulo central, llamado dominio E, contiene los extremos amino de las 6 cadenas incluyendo los fibrinopéptidos (Fp) mientras que los dos nódulos distales llamados dominios D contienen los extremos carboxilo de las cadenas $A\alpha$, $B\beta$ y γ . El fibrinógeno se escinde proteolíticamente en el extremo amino de las cadenas $A\alpha$ y $B\beta$ liberando fibrinopéptidos A y B (FpA y FpB) y se reúne en un monómero de fibrina mediante la trombina, una serin-proteasa que se reúne a partir de su forma inactiva mediante el factor Xa. Los monómeros de fibrina resultantes se unen de manera no covalente en protofibrillas mediante contactos DE sobre moléculas de fibrina vecinas. Esto impone un modo de elaboración de la cadena polimérica de fibrina por superposición medio escalonada. Los contactos también se establecen a lo largo entre dominios D adyacentes (contactos DD) conduciendo a una agregación lateral. Otra serin-proteasa, el factor XIII, se escinde de manera proteolítica mediante la trombina en presencia de Ca^{++} a una forma activada. Este factor XIII activado (factor XIIIa) cataliza la reticulación de la fibrina polimerizada mediante la creación de enlaces isopeptídicos entre las cadenas laterales de lisina y glutamina. Los primeros enlaces glutamil-lisil que se forman están en el C-terminal de las cadenas γ produciendo reticulaciones D-D. Posteriormente, se forman múltiples reticulaciones entre cadenas $A\alpha$ adyacentes, el proceso de reticulación confiere al coágulo tanto una estabilidad biológica (resistencia a la fibrinólisis), como una estabilidad mecánica [Sienbenlist y Mosesson. Progressive Cross-Linking of Fibrin γ -chains Increases resistance to Fibrinolysis, Journal of Biological Chemistry, 269:28414-28419, 1994].

30 El proceso de coagulación puede modificarse fácilmente en un sistema *in vitro* adhesivo autosuficiente teniendo como un componente el fibrinógeno y el factor XIII y como el segundo componente trombina y Ca^{++} que cataliza el proceso de polimerización. Estos sistemas de adhesión, conocidos en la técnica como "sellador de fibrina" o "adhesivos tisulares de fibrina" han encontrado numerosas aplicaciones en procedimientos quirúrgicos y como dispositivos de administración para una gama de compuestos farmacológicamente activos [Sierra, Fibrin Sealant Adhesive Systems: A Review of Their Chemistry, material Properties and Clinical Applications, Journal of Biomaterials Applications, 7: 309-352, 1993].

40 Se ha estimado que la necesidad clínica anual en los EE.UU. de selladores de fibrina supera con mucho los 300 kg/año que pueden recogerse utilizando los métodos actuales de crioprecipitación utilizados por los fraccionadores de plasma. Por tanto, se han explorado fuentes alternativas de fibrinógeno, con mucho el principal componente del sellador de fibrina, habiéndose favorecido fuentes recombinantes [Butler *et al.*, Current Progress in the Production of Recombinant Human Fibrinogen in the Milk of Transgenic animals. Trombosis and Haemostasis, 78: 537-542, 1997]. Se ha demostrado que los mamíferos son capaces de producir fibrinógeno humano transgénico a niveles de hasta 5,0 g/l en su leche haciendo de éste un método comercialmente viable para la producción de fibrinógeno humano [Prunkard *et al.*, High-level expresión of recombinant human fibrinogen in the milk of transgenic mice, Nature Biotechnology, 14: 867-871, 1996; Cotting-ham *et al.*, Human fibrinogen from the milk of transgenic sheep. En. Tissue Sealants: Current Practice, Future Uses. Cambridge Institute, Newton Upper Falls, MA, 30 de marzo 2 de abril de 1996 (resumen)].

55 Se han identificado diferencias entre el fibrinógeno humano recombinante y el fibrinógeno que se ha purificado a partir de plasma humano. El fibrinógeno que se ha purificado a partir de plasma humano tiene dos cadenas gamma alternativamente escindidas (γ y γ'). Por el contrario, el fibrinógeno humano recombinante sólo tiene la forma γ principal, además la glucosilación de las cadenas beta y gamma (no hay glucosilación unida a N de la cadena alfa) del fibrinógeno humano recombinante difiere ligeramente de la del fibrinógeno derivado del plasma, pero es similar a la glucosilación encontrada en otras proteínas expresadas en la leche de animales transgénicos. Además, la Ser³ de la cadena alfa del fibrinógeno humano recombinante se fosforila mucho más que la Ser³ de la cadena alfa del fibrinógeno derivado del plasma, aunque la diferencia de fosforilación no da como resultado diferencias funcionales. Además, existen diferencias detectables en la heterogeneidad producida por la proteólisis en C-terminal de una serie de sitios muy sensibles a proteasa en las cadenas alfa. También se observan diferencias de magnitud similar entre el fibrinógeno derivado del plasma a partir de otras fuentes.

60 Es bien sabido que la leche contiene una serie de serin-proteasas; de éstas, la plasmina - proteasa alcalina, que se produce en la leche junto con su zimógeno inactivo plasminógeno, es la proteasa más significativa que contribuye a la actividad proteolítica. La concentración de plasmina (plasminógeno) varía con el estado de salud del animal, por ejemplo, los animales con mastitis muestran una mayor actividad proteolítica. También influye en la actividad proteolítica de la leche su fase de lactación, es decir, la lactación tardía se asocia con mayores concentraciones de plasmina [Politis y Ng Kwai Hang, Environmental Factors Affecting Plasmin Activity in Milk, Journal of Dairy Science, 72: 1713-1718, 1989]. En la leche, la plasmina (el plasminógeno) se asocia principalmente a las micelas de caseína, aunque también puede encontrarse en menor parte en el suero de la leche [Politis *et al.*, Distribution of Plasminogen and Plasmin in Fractions of Bovine Milk, Journal of dairy Science, 75: 1402-1410, 1992].

La plasmina es la serin-proteasa predominantemente responsable de la solución de los coágulos de fibrina in vivo y su presencia es esencial para la hemostasia. Es muy probable que cualquier producto de degradación del fibrinógeno de la leche sea un resultado de la acción de las proteasas de la leche. Por tanto, la presencia de plasmina u otras proteasas en la leche pueden ir en detrimento de la calidad del fibrinógeno que se produce por parte del animal transgénico lactante si no se toman medidas para minimizar su efecto. De igual importancia es la extracción de cualquier producto de degradación del fibrinógeno que pudiera resultar de la acción de la plasmina u otra proteasa de la leche. En la técnica está bien establecido el uso de los inhibidores de proteasa para minimizar la proteólisis y normalmente implica la adición de un cóctel de inhibidores de especificidad variable. Con los animales transgénicos se ha comprendido la posibilidad del daño proteolítico a la proteína recombinante y se han propuesto sugerencias para limitar la degradación (Wilkins y Velander, Isolation of Recombinant Proteins from Milk, Journal of Cellular Biochemistry, 49: 33-338, 1992; Velander *et al.*, documento PCT WO 95/22249). Sin embargo, constantemente constituyen un deseo la obtención de métodos cada vez más eficaces.

En la purificación de las proteínas de la leche, un requisito es la separación de la proteína deseada de las micelas de caseína contaminantes. Para el aislamiento de proteínas transgénicas tales como la AAT, la primera etapa es la precipitación con PEG u otro agente, tal como sulfato de amonio. Éste no precipita la AAT, pero precipita la caseína y, por tanto, es una buena manera de retirar la caseína de la AAT. Sin embargo, cuando esta enseñanza se aplicó al fibrinógeno transgénico de la leche, se observó que no sólo precipitó la caseína, sino que el fibrinógeno precipitó con ella. Claramente, ésta no era una medida adecuada para retirar la caseína del fibrinógeno. Además, el fibrinógeno en el precipitado de caseína/fibrinógeno era inestable y se dañaba proteolíticamente de manera muy rápida, probablemente debido a la precipitación conjunta con enzimas proteasas. Así, el problema era cómo separar la caseína de las proteínas similares al fibrinógeno en una muestra de leche o una fracción de la misma. La separación de la plasmina (del plasminógeno) de las micelas de caseína puede llevarse a cabo mediante la incubación con agentes tales como ácido 6-aminohexanoico (ácido ϵ -aminocaproico, ϵ ACA). Sin embargo, el ácido 6-aminohexanoico también aumenta la activación del plasminógeno hacia plasmina lo cual puede acelerar la proteólisis de cualquier proteína susceptible deseada. Además, la separación de plasmina (plasminógeno) de las micelas de caseína no ayuda a la separación de las micelas de caseína de las proteínas similares al fibrinógeno.

Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad de separar las proteínas deseadas de las micelas de caseína sin acelerar la proteólisis de la proteína deseada.

El fibrinógeno de plasma humano parece heterogéneo mediante SDS-PAGE y otros métodos de separación de proteínas basados en el tamaño. Una fracción de alto peso molecular (fibrinógeno APM, fibrinógeno 1 o F1) con un peso molecular de 340.000 daltons contribuye aproximadamente en un 50-70% del antígeno de fibrinógeno total. El fibrinógeno de bajo peso molecular (fibrinógeno BPM, fibrinógeno 2 o F2) con un peso molecular de aproximadamente 300.000 daltons contribuye en un 20-40%. La cantidad residual, designada como fibrinógeno de bajo peso molecular' (fibrinógeno BPM', fibrinógeno 3, F3 o fragmento X) tiene un peso molecular de aproximadamente 280.000 daltons. Se ha demostrado que las principales diferencias en estas moléculas de fibrinógeno resultan del daño proteolítico a la región del extremo carboxilo de las cadenas $A\alpha$ (región C-terminal de $A\alpha$) que dan como resultado diferentes longitudes extremo carbonilo de la cadena $A\alpha$ ("A α chain C-terminus"). El fibrinógeno, purificado a partir del crioprecipitado mediante el uso de técnicas de precipitación, ha demostrado tener una cadena $A\alpha$ parcialmente digerida [Stroetmann, Patente de los EE.UU. n° 4.427.650]. Aunque primero se pensó que la plasmina o enzimas similares a la plasmina eran responsables de la degradación del fibrinógeno F1 hacia las subfamilias F2 y F3 [Lipinska *et al.*, Fibrinogen Heterogeneity in Human Plasma: Electrophoretic demonstration and characterization of two major fibrinogen components, Journal of Laboratory & Clinical Chemistry, 84: 509-516, 1974] es evidente que la plasmina por sí misma probablemente no sea responsable de la proteólisis directa de F1 a fibrinógeno F2 [Dempfle *et al.*, Fibrinogen Heterogeneity in Homozygous Plasminogen Deficiency Type 1: Further Evidence that plasmin is not involved in formation of LMW and LMW'-Fibrinogen, Trombosis and Haemostasis, 77: 879-883, 1997]. Se ha sugerido que el fibrinógeno F2 puede ser realmente un grupo de productos de degradación producido por varias enzimas incluyendo metalo-proteasas de matriz [Nakashima *et al.*, Human Fibrinogen Heterogeneity: the COOH-terminal residues of defective $A\alpha$ chains of fibrinogen II, Blood Coagulation and Fibrinolysis, 3: 361-370, 1992]. El fibrinógeno recombinante expresado en células CHO también ha demostrado ser una composición heterogénea de fibrinógeno F1 y una subfracción similar a F2 más pequeñas que también carece de la región C-terminal de la cadena $A\alpha$ ilustrando que el fibrinógeno recombinante también es susceptible a la proteólisis [Gorkun *et al.*, The conversion of fibrinogen to fibrin: Recombinant fibrinogen typifies plasma fibrinogen, Blood 89: 4407-4414]. Del mismo modo, el fibrinógeno humano recombinante, producido en levaduras, también ha demostrado poseer una fracción similar a F2 que tiene cadenas $A\alpha$ parcialmente degradadas [Roy *et al.*, Secretion of Biologically Active fibrinogen by Yeast, Journal of Biological Chemistry, 270: 23761-23767, 1995], demostrando que cabe esperarse el daño de la cadena $A\alpha$ una serie de hospedadores de expresión. Además de los fragmentos principales F2 y F3, existe una serie de fragmentos más pequeños generados a partir del fibrinógeno denominado productos de la degradación del fibrinógeno (FDP - Fibrinogen Degradation Product). El F3 también se denomina con frecuencia como FDP. Estos FDP (fragmento Y, D y E) están bien caracterizados y pueden encontrarse en pequeñas cantidades en el plasma humano.

Varios investigadores han observado diferencias en la velocidad de la formación de coágulo, la estructura del coágulo final y las propiedades mecánicas del coágulo final para cada uno de los fragmentos de fibrinógeno principales. Además, se ha investigado la presencia de FDP, y su influencia en la evolución de la coagulación. Gorkan *et al.*, [Role of the α C domains of fibrin in clot formation, Biochemistry 33: 6986-6997, 1994] establecieron que el fibrinógeno F1 es coagulable en un 95%, mientras que el fibrinógeno F2 es coagulable en un 92%. Aunque la capacidad de

coagulación de estas dos fracciones parece similar, se observó una marcada diferencia en el tiempo de coagulación, es decir, aparición de la formación de coágulo visible tras la acción de la trombina, mostrando el fibrinógeno F2 un lapso de tiempo mayor antes de la formación del coágulo. Esto también se ha observado previamente (por ejemplo, Hola *et al.*, 1985, Purification and Characterization of 3 Fibrinogens with different molecular weights obtained from Normal Human Plasma, Trombosis & Haemostasis, 37: 165-176) cuando se observó que el fibrinógeno F1 tenía un tiempo de coagulación de 14 segundos en comparación con los 20 segundos para F2 y los 25 segundos para F3. Por tanto, la evidencia sugiere que el grado de proteólisis del extremo carboxilo de $A\alpha$ influye en la polimerización de fibrina. La estructura tridimensional del coágulo también se ve influida por el grado de degradación de las regiones αC del fibrinógeno. Los coágulos formados a partir de fibrinógeno F2 y F3 muestran un alto grado de ramificación de protofibrillas con una mayor porosidad. Se ha postulado que los fibrinógenos degradados tienen más tendencia a la agregación lateral de las protofibrillas. Esto conduce a la formación de fibras más densas ("thicker") dando como resultado coágulos más gruesos tal como se observa mediante experimentos de dispersión de luz. Evidencias adicionales de la importancia del extremo carboxilo de la cadena $A\alpha$ en la formación de coágulos surgen del hecho de que los coágulos formados a partir de fibrinógeno Milano III, una variante que se produce de manera natural con cadenas $A\alpha$ truncadas, muestran un menor grado de ramificación de protofibrillas [Burlan *et al.*, Binding of Calcium ions and their effect on clotting of Fibrinogen Milano II, a variante with truncated $A\alpha$ chains, Blood Coagulation and Fibrinolysis, 7: 331-335, 1995]. También se han observado diferencias en las propiedades mecánicas de los coágulos formados con diferentes especies de fibrinógeno, en las que los coágulos formados a partir de F2 y F3 parecieron menos resistentes a trastornos mecánicos. La tromboelastografía (TEG) revela que los coágulos hechos de fibrinógeno F1 eran más elásticos que los coágulos formados a partir de fibrinógeno F2 [Hagesawa y Sasaki, Location of the binding site "b" for lateral polymerisation of fibrin, Trombosis Research, 57: 183-195, 1990]. La elasticidad es una propiedad que se prefiere para los selladores de fibrina cuyo uso puede incluir la aplicación en una cirugía de articulación o tendón.

Las regiones C-terminales de las cadenas $A\alpha$ también sirven para otros fines distintos de la formación de coágulos. Engloban sitios de reticulación para la transglutaminasa, el factor XIIIa, cuando el FXIIIa cataliza la formación de enlace isopeptídico entre moléculas de fibrinógeno adyacentes añadiendo así fortaleza y estabilidad al coágulo. La reticulación además aumenta la resistencia de los coágulos a la proteólisis y es responsable de localizar otras moléculas implicadas en el proceso de coagulación en la superficie del coágulo más particularmente $\alpha 2$ -antiplasmina, que se reticula de manera covalente en las cadenas $A\alpha$ por parte del factor XIIIa que favorece adicionalmente la estabilidad del coágulo a la degradación proteolítica [Rudchenko *et al.*, Comparative, Structural and Functional Features of the Human αC domain and the Isolated $\alpha 1$: Fragment, Journal of Biological Chemistry, 271: 2523-2530, 1996]. La fibronectina, la trombospondina y el factor de von Willebrands también se reticulan en esta región. Las regiones-C de $A\alpha$ también son importantes para favorecer la activación del plasminógeno por parte de tPA en la superficie del coágulo, conduciendo por tanto a la fibrinólisis eficaz [Matsuka *et al.*, Factor XIIIa catalysed crosslinking of Recombinant αC fragments of Human Fibrinogen, Biochemistry, 35: 5810-5816, 1996]. También se ha postulado que el extremo carboxilo de $A\alpha$ del fibrinógeno incluye sitios de reconocimiento específico para receptores plaquetarios localizados en los residuos $A\alpha 572$ hasta $A\alpha 574$ [Hawiger, Adhesive end of fibrinogen and its adhesive peptides: The end of a saga, Seminars in Haematology, 32: 99-109, 1995]. La agregación plaquetaria es esencial para la hemostasia y por tanto, puede esperarse que las moléculas de fibrinógeno que tienen cadenas $A\alpha$ degradadas sean menos capaces de agregar plaquetas.

La importancia de las regiones C-terminales de $A\alpha$ para las propiedades del fibrinógeno ha inspirado el desarrollo de técnicas mediante las cuales las moléculas de fibrinógeno tienen diversos grados de proteólisis de la cadena $A\alpha$ pueden separarse para su estudio. Se han descrito diversos métodos para la separación de las subfamilias de fibrinógeno y FDP principales. Por ejemplo, se han utilizado técnicas de precipitación para separar F1 y F2 del fibrinógeno purificado [Sasaki y Kito, Simplified determination of fibrinogen sub-fractions by glycine precipitation, Trombosis and Haemostasis 42: 440-443, 1979]. Hola *et al.*, han descrito un método para la separación de fibrinógeno de plasma purificado en las subfamilias F1, F2 y F3 utilizando una serie de precipitaciones con sulfato de amonio. Se han separado F3, fragmentos Y, D y E en base al tamaño utilizando una cromatografía de exclusión por tamaños [Morder y Rápale Shulman, High molecular weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin, Journal of Biological Chemistry, 244: 2120-2124, 1969]. Estos autores también han demostrado que el fibrinógeno F3 y los FDP Y, D y E poseen realmente una actividad anticoagulante e inhiben la formación de coágulos; una característica no deseada de una molécula utilizada para preparar un adhesivo quirúrgico. La mayor atención se ha prestado a los productos de degradación terminal D y E que se han separado utilizando una cromatografía de intercambio aniónico [Kemp *et al.*, Plasmic degradation of fibrinogen: the preparation of a low molecular weight derivative of fragment D, Trombosis and Haemostasis, 3: 553-564, 1973], cromatografía de intercambio catiónico [Rutjven Vermeer *et al.*, A novel method for the purification of rat and human fibrin(ogen) degradation products, Hoppe-Seyler's Z. Physiological Chemistry, 360: 633-637] cromatografía lisina-sepharose [Rupp *et al.*, Fractionation of plasmic fibrinogen digest on Lisien agarose. Isolation of two fragments D, fragment E and simultaneous removal of plasmin, Thrombosis Research, 27: 117-121, 1982] y cromatografía de afinidad con Zinc quelado [Structural features of fibrinogen associated with binding to chelated zinc, Scully y Kakkar, Biochim et Biophys. Acta., 700: 130-133, 1982]. En ninguno de los métodos anteriores se ha descrito la separación simultánea de fibrinógeno en las subfracciones F1, F2 & F3 y FDP Y, D y E utilizando una única técnica.

Tal como se presentó anteriormente, la plasmina es la serin-proteasa que es predominantemente responsable de la solución de los coágulos de fibrina *in vivo* y su presencia es esencial para la hemostasia. Sin embargo, tal como se trató anteriormente, aunque todavía se debate sobre la participación de la plasmina en la degradación de la cadena $A\alpha$ del F1, F2 y F3, es muy probable que cualquier producto de degradación del fibrinógeno de la leche se obtendrá como resultado de la acción de las proteasas de la leche. Por lo tanto, la presencia de la plasmina u otras proteasas en la leche

puede ir en detrimento de la calidad del fibrinógeno que se produce por parte de un animal transgénico lactante si no se toman medidas para minimizar su efecto. De igual importancia es la extracción de cualquier producto de degradación del fibrinógeno que pudiera resultar de la acción de la plasmina u otra proteasa de la leche. En la técnica está bien establecido el uso de los inhibidores de proteasa para minimizar la proteólisis y normalmente implica la adición de un cóctel de inhibidores de especificidad variable.

De la discusión anterior, está claro que la incorporación de los productos de degradación del fibrinógeno (fibrinógeno F3, fragmentos Y, D y E) e incluso de fibrinógeno F2 en las preparaciones cuyo uso final sería o bien como agentes de hemostasia o bien agentes selladores, no es deseable. Serían de uso considerable las técnicas que puedan incorporarse en una purificación de fibrinógeno a partir de la leche de animales transgénicos que reduzca productos de degradación de fibrinógeno permitiendo que se produzca una integridad definida de la cadena A α para diversas aplicaciones.

La invención proporciona un método eficiente y eficaz por el cual se recupera y purifica una proteína producida en la leche de animales transgénicos.

Esta solicitud de patente describe técnicas mediante las cuales puede llevarse a cabo una purificación parcial de fibrinógeno. Se utilizan técnicas de precipitación que incluyen agentes químicos capaces de alterar las interacciones entre las enzimas proteasas y la caseína. Utilizando estas técnicas es posible mantener el producto de fibrinógeno alejado de la dañina actividad proteasa en las fases iniciales del procesamiento y, posteriormente, eliminar la actividad proteasa. La precipitación se lleva a cabo de tal manera que permite la recogida de un compuesto sustancialmente purificado (hasta en un 85%) con muy poca actividad proteasa residual. Esta ausencia de enzimas proteasas hace más estable el fibrinógeno durante el procesamiento posterior, mejorando así el rendimiento del producto y renunciando a la necesidad de un equipo de refrigeración caro o inhibidores de proteasas tóxicos que tendrían que extraerse.

Esta solicitud de patente describe técnicas cromatográficas para la purificación de proteínas, en particular fibrinógeno de la leche y para la extracción de productos de degradación del fibrinógeno (fragmentos X, Y, D, E y fragmentos de cadena A C-terminales). Utilizando estas técnicas es posible purificar fibrinógenos hasta y al menos un 99% de pureza. Además, el uso de estas técnicas permite una selección previa de las moléculas de fibrinógeno en un producto con respecto a la integridad de la cadena A. Así, se hace posible seleccionar un producto de fibrinógeno que podría componerse de un 100% de fibrinógeno F1 o un 80% de fibrinógeno F1 o cualquier otra concentración inferior de F1. Como el fibrinógeno F1 tiene unas características funcionales superiores con respecto a la elasticidad, rigidez y estabilidad del coágulo, la capacidad para predeterminar y por tanto seleccionar el contenido de F1, permite que se produzca una gama de productos de fibrinógeno con diversos fines. La extracción de los productos de degradación también permite un sellador de fibrinógeno superior de una manera controlada y reproducible.

Por consiguiente, el primer aspecto de la presente invención proporciona un método para la purificación parcial de una proteína deseada a partir de la leche, comprendiendo el método la transferencia de una enzima proteasa que está presente en la leche, en la fase de suero de la leche con la extracción o distribución de la proteína deseada hacia otra fase de la leche.

Las proteínas deseadas según la presente invención son cualquiera de las que pueden producirse en la leche, incluyendo proteínas de la leche producidas de manera natural y proteínas transgénicas. Proteínas preferidas según la presente invención son las que tienen características similares al fibrinógeno que resultan en la precipitación conjunta con la caseína en presencia de PEG o sulfato de amonio. Tales proteínas incluyen, pero no se limitan a; fibrinógeno, colágeno, fibronectina, factor VIII y alfa-2-macroglobulina.

La presente invención se refiere preferiblemente al aislamiento de proteínas transgénicas a partir de la leche, es decir, proteínas producidas como resultado de la manipulación transgénica de un animal. Esto permite, en consecuencia, el aislamiento de proteínas, tales como fibrinógeno, colágeno, fibronectina, factor VIII y alfa-2-macroglobulina a partir de leche animal que, normalmente, no contiene tales proteínas. La presente invención es útil para la producción y el aislamiento de proteínas individuales per se, o proteínas que se han alterado de alguna manera para facilitar la expresión transgénica tal como mediante fusión a otras proteínas.

En el presente texto, el término "purificación parcial" significa purificación hasta un nivel de desde el 50% libre de otros contaminantes, preferiblemente 60, 70, 80, 90% libre de otros contaminantes. Preferiblemente, las tasas de recuperación están en el intervalo del 50% a aproximadamente el 80%, más preferiblemente en el intervalo del 65% al 85%.

La presente invención se refiere al aislamiento del fibrinógeno, en particular, fibrinógeno transgénico a partir de la leche, es decir, producido como resultado de la manipulación transgénica de un animal. Esto permite, en consecuencia, el aislamiento de fibrinógeno a partir de leche animal, leche que, normalmente, no contiene tales proteínas. La presente invención es útil para la producción y el aislamiento de la proteína fibrinógeno per se, o fibrinógeno que se ha alterado de alguna manera para facilitar la expresión transgénica tal como mediante fusión a otras proteínas.

Cuando la proteína deseada es fibrinógeno, el método para la purificación parcial del mismo se sigue opcionalmente por una etapa de método que comprende:

ES 2 267 289 T3

(a) poner en contacto el fibrinógeno purificado parcialmente con una resina de cromatografía de interacción hidrófoba en condiciones en las que el fibrinógeno se une a la resina; y

(b) extraer la proteína unida mediante elución.

5

Preferiblemente el fibrinógeno purificado parcialmente, a purificar adicionalmente de manera opcional mediante las etapas a) y b) descritas anteriormente, está en forma líquida, bien como resultado directo de la primera parte del método, o bien de otro modo.

10

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “fibrinógeno” se refiere a la proteína estructural principal responsable de la formación de coágulos e incluye la forma de glucoproteína completa del fibrinógeno así como otras especies de fibrinógeno relacionadas, incluyendo el fibrinógeno truncado, variantes de la secuencia aminoacídica (muteínas o variantes polimórficas) de fibrinógeno, una especie de fibrinógeno que comprenda residuos adicionales y cualquier variante del mismo que ocurra de manera natural. Las mismas variaciones descritas en relación al fibrinógeno también se aplican a otras proteínas similares al fibrinógeno que pueden aislarse a partir de la leche según la presente invención.

15

20

Tal como se utiliza en el presente documento, se entiende que “leche” sea el fluido secretado desde las glándulas mamarias de animales. La leche según la presente invención incluye leche entera, leche desnatada, fracción de leche y leche calostroal. También incluye un fluido derivado de la leche en el que la proteína deseada, en particular el fibrinógeno, se produjo originalmente en la leche.

25

La presente invención permite la purificación parcial de la proteína deseada mediante la transferencia de enzimas proteasas presentes en la leche lejos de la fase en la que se obtiene la proteína deseada. La enzima proteasa se transfiere hacia la fase de suero de la leche (siendo la fase de suero de la leche la fase/parte/fracción de la leche que contiene predominantemente proteínas distintas a la caseína) con la extracción o distribución de la proteína deseada hacia otra fase de la leche. La extracción o distribución de la proteína deseada puede ser simultánea a la transferencia de la enzima proteasa en la fase de suero de la leche. Alternativamente, es posible tener un proceso de dos etapas, mediante el cual la enzima proteasa se transfiere en primer lugar al suero de la leche en condiciones que retrasan el daño proteolítico a la proteína deseada, seguido de la extracción o distribución de la proteína deseada. Tales condiciones pueden construirse utilizando inhibidores de proteasa o bajas temperaturas. La transferencia de la enzima proteasa a la fase de suero de la leche se refiere, predominantemente, a la transferencia de la plasmina y/o del plasminógeno. También pueden transferirse otras proteasas de la leche, tales como las serin-proteasas (alcalinas o ácidas).

30

35

La proteína deseada se recupera a partir de la leche mediante el uso de técnicas de precipitación bien conocidas para los expertos en la técnica, tales como el uso de agentes de precipitación que incluyen, pero no exclusivamente, PEG, sulfato de sodio, sulfato de amonio, glicina o temperatura. Preferiblemente, la precipitación se lleva a cabo con concentraciones generalmente bajas de los agentes de precipitación química (por ejemplo, sulfato de sodio y amonio al 5-20% p/v, glicina o β -alanina al 5-20% p/v, PEG al 2-15%) ya que esto reduce la precipitación conjunta de las proteínas del suero de la leche.

40

45

La transferencia de la enzima proteasa en la fase de suero de la leche es preferiblemente por la presencia de lisina o un análogo de lisina tal como el ácido ϵ -aminocaproico u otros aminoácidos básicos, tales como arginina o histidina. La concentración de lisina o un análogo de lisina, según la invención, depende de una serie de factores tales como el tipo de leche a partir de la cual se está purificando la proteína deseada, la cantidad de proteína deseada presente y la manera de extracción o distribución de la proteína deseada a partir de la fase de suero de la leche. Las concentraciones oscilan, normalmente, de 1 mM-2M, preferiblemente de 10-200 mM.

50

Más preferiblemente, el método del primer aspecto de la invención se repite al menos una vez, y hasta aproximadamente cuatro veces. Esta repetición puede aumentar en gran parte la pureza de las proteínas deseadas, en particular, con respecto a las micelas contaminantes.

55

El método según el primer aspecto de la invención aumenta la estabilidad de la proteína deseada parcialmente purificada frente a la proteólisis, especialmente cuando la proteína deseada es una proteína transgénica.

En la segunda etapa opcional del primer aspecto de la invención, cuando la proteína deseada es fibrinógeno, se utiliza una resina de cromatografía de interacción hidrófoba.

60

En la técnica se conocen resinas de cromatografía de interacción hidrófoba (Hydrophobic Interaction Chromatography - HIC) e incluyen resinas tales como Butyl Sepharose™ (Amersham Pharmacia Biotechnology), Fenil Sepharose (de sustitución baja o elevada), Octal Sepharose y Alquil Sepharose (todas de Amersham Pharmacia Biotechnology; otras fuentes de HIC incluyen Biosepra, Francia; E. Merck, Alemania; BioRad, EE.UU.).

65

Las condiciones en las que se ponen en contacto el fibrinógeno con la resina de cromatografía de interacción hidrófoba, para permitir que el fibrinógeno se una a la resina, incluyen la presencia de cualquier (solución de) sal “formadora de estructuras” (“structure forming”), tal como sulfato de amino, sulfato de sodio y otras sales tales como las descritas en: Melander y Horuath, Salt Effects on Hydrophobic Interactions in Precipitation and Chromatography: An Interpretation of the Lyotropic Series, Archives of Biochemistry and Biophysics, 183: 200-215, 1977 y Srinivason

y Ruckenstein, Role of Physical Forces in Hydrophobic Interaction Chromatography, Separation and Purification Methods, 9: 267-370, 1980. La extracción de la proteína unida es mediante técnicas de elución convencionales conocidas en la técnica. Tal elución puede llevarse a cabo disminuyendo la concentración de la sal formadora de estructuras, tal como disminuyendo la concentración de sulfato de amonio en el tampón de elución. La elución puede ser una
 5 elución en gradiente o más preferiblemente, mediante una serie de etapas para predeterminar y así definir el fibrinógeno que se eluye desde la columna en términos de sus razones de subfracciones y por tanto, la integridad de su cadena A α .

La etapa de método opcional del primer aspecto de la invención incluye una etapa de lavado de la resina, para
 10 extraer componentes no unidos, entre las etapas (a) y (b). Normalmente, el lavado de la resina se lleva a cabo con un tampón de lavado que tiene en él la misma concentración de sal que la que se utilizó para la carga. Es posible una mayor concentración de sal en el tampón de lavado, pero no se prefiere.

Cuando se utiliza la segunda etapa de método opcional del primer aspecto de la invención, se logra al menos algo
 15 de lo siguiente:

- (a) aumenta la pureza del fibrinógeno
- (b) resuelve el fibrinógeno en sus fracciones
- (c) permite el aislamiento de una cadena A α de fibrinógeno de mayor integridad

Como la presente invención se aprovecha de la manipulación genética de animales con el fin de obtener proteínas
 25 a partir de fuentes transgénicas ("fibrinógeno transgénico"), la fuente de fibrinógeno puede seleccionarse con mucho cuidado. Preferiblemente, el fibrinógeno deriva de humano, bovino u ovino (es decir, que corresponde esencialmente a fibrinógeno humano, bovino u ovino). Para fines médicos, se prefiere emplear proteínas naturales al paciente a quien vayan dirigidas. Por tanto, se prefiere el fibrinógeno transgénico humano. Cuando el fibrinógeno se codifica de manera recombinante, es decir fibrinógeno de otra especie distinta a la especie en la que se está expresando, el patrón de glucosilación puede ser diferente del patrón de glucosilación del fibrinógeno que se produce de manera natural. Por
 30 tanto, puede preferirse, para la fuente de fibrinógeno transgénico, un animal transgénico más próximo en la taxonomía biológica.

Claramente; se prefiere cualquier animal que produce leche, y, animales que puedan manipularse genéticamente
 35 para producir fibrinógeno transgénico en su leche. A este respecto, los animales que lactan y producen leche adecuada incluyen oveja, vaca, cabra, conejo, búfalo de agua, cerdo o caballo. Los animales transgénicos para la producción de una proteína transgénica según la presente invención, no incluyen seres humanos transgénicos.

Un segundo aspecto de la invención proporciona un método para la purificación parcial de una proteína deseada a
 40 partir de leche, comprendiendo el método la precipitación de la proteína deseada en presencia de lisina o un análogo de lisina. Cuando la proteína deseada es fibrinógeno, el método se sigue opcionalmente de una etapa de método que comprende:

- (a) poner en contacto el fibrinógeno purificado parcialmente con una resina de cromatografía de interacción hidrófoba en condiciones en las que el fibrinógeno se une a la resina; y
- (b) extraer la proteína unida mediante elución.

Un segundo aspecto de la invención relacionado proporciona el uso de lisina o un análogo de lisina en la purifi-
 50 cación de una proteína deseada a partir de la leche (preferiblemente, una proteína transgénica). El uso de la lisina o un análogo de lisina en este aspecto de la invención se combina, preferiblemente, con la precipitación de la proteína deseada.

Todas las descripciones y detalles con respecto al primer aspecto de la invención, también se aplican al segundo.

La presente invención proporciona adicionalmente un método útil, mediante el cual se recupera fibrinógeno a partir
 55 de un fluido.

Un tercer aspecto de la presente invención proporciona un método para la obtención de fibrinógeno a partir de un
 60 fluido, comprendiendo el método:

- (a) puesta en contacto con una resina de cromatografía de interacción hidrófoba en condiciones en las que el fibrinógeno se une a la resina; y
- (b) extracción de la proteína unida mediante elución.

El fluido que contiene fibrinógeno puede ser cualquiera. En particular, es uno o más fluidos corporales animales
 65 tales como leche, plasma sanguíneo u orina. Es, en particular, un fluido que contiene fibrinógeno que se deriva o se ha derivado de un fluido corporal de un animal (tal como uno de los descritos anteriormente) y/o un fluido que se

ha utilizado para solvatar el fibrinógeno, por ejemplo, tras una etapa de método previa tal como purificación parcial mediante precipitación.

Según algunos de los métodos de la presente invención puede utilizarse cualquier fluido corporal animal. Fluidos corporales preferidos incluyen leche, plasma sanguíneo u orina. Claramente, la producción natural de fibrinógeno en algunos fluidos corporales, tales como el plasma, puede proporcionar un fluido corporal animal a partir del cual puede aislarse fibrinógeno que se produce naturalmente. Sin embargo, la presente invención se refiere, preferiblemente, al aislamiento del fibrinógeno transgénico como resultado de la manipulación transgénica de un animal. Esto permite, en consecuencia, el aislamiento de fibrinógeno a partir de fluidos corporales animales que no contienen fibrinógeno de manera natural, tal como la leche y la orina. La presente invención es útil para la producción de fibrinógeno per se o fibrinógeno que se ha alterado de alguna manera para facilitar la expresión transgénica, tal como mediante la fusión a otras proteínas.

El término “plasma sanguíneo” incluye plasma de sangre completa o cualquier fracción de la misma. El término “orina” también se refiere a orina completa, o fracciones de la misma, en particular, orina concentrada.

Preferiblemente, el fluido es leche o un fluido derivado de la leche. En tales situaciones (en las que el fluido es leche o derivado de la leche) el método según el tercer aspecto de la invención puede precederse opcionalmente mediante una etapa de método que comprende la purificación parcial de fibrinógeno a partir de leche, comprendiendo el método la transferencia de la enzima proteasas que está presente en la leche, hacia la fase de suero de la leche con la extracción o distribución del fibrinógeno hacia otra fase de la leche.

La etapa de método opcional precedente purifica al menos parcialmente el fibrinógeno a partir de la leche, permitiendo así una mejor purificación y/o separación del fibrinógeno en virtud de la etapa de método de HIC.

Claramente, se contempla cualquier animal que produzca un fluido corporal que pueda usarse según el tercer aspecto de la invención. Preferiblemente, se prefieren animales que puedan manipularse genéticamente para producir fibrinógeno transgénico en su leche. A este respecto, los animales que lactan y producen leche adecuada incluyen oveja, cabra, vaca, camello, conejo, búfalo de agua, cerdo o caballo. Estos animales también pueden ser útiles para la producción de otros fluidos corporales según la invención. Los animales transgénicos para la producción de una proteína transgénica según la presente invención, no incluyen seres humanos transgénicos.

Con el fin de conseguir el máximo resultado a partir del método según el primer aspecto de la invención, puede ser preferible purificar al menos parcialmente el fibrinógeno a partir del fluido corporal de un animal. Una purificación de este tipo depende del fluido corporal a partir del cual se deriva el fibrinógeno y de la naturaleza de los contaminantes potenciales presentes. Preferiblemente, el fibrinógeno se purifica hasta un nivel de desde el 20 hasta el 40% antes de experimentar el método según el primer aspecto de la invención. Puede utilizarse cualquier método de purificación previa, por ejemplo los conocidos en la técnica, por ejemplo, precipitación de fibrinógeno tal como se describe en el documento PCT WO 95/22249. El hecho de que el fibrinógeno ya puede estar parcialmente purificado antes de la aplicación del primer aspecto de la invención, no resta valor al hecho de que el fibrinógeno puede haberse producido originalmente en el fluido corporal de un animal.

Todas las descripciones y detalles con respecto a las características de los aspectos primero y segundo de la invención también se aplican al tercero. Los detalles de la etapa de HIC opcional en los aspectos primero y segundo se aplican a la etapa de HIC en el tercer aspecto.

Según el tercer aspecto de la invención, un tercer aspecto relacionado proporciona el uso de HIC en uno o más de los siguientes puntos:

(a) aumentar la pureza del fibrinógeno

(b) resolver el fibrinógeno en sus fracciones

(c) seleccionar fibrinógeno con cadenas A α de integridad elevada a partir de fibrinógeno en un fluido, preferiblemente un fluido corporal de un animal.

El uso de HIC en el sexto aspecto de la invención se realiza preferiblemente en combinación con una solución de sal tal como se describe según el primer aspecto de la invención. Las características preferidas relevantes de los aspectos primero y segundo también se aplican al tercero. El uso de la HIC en todos los aspectos relevantes de la invención incluyen un formato discontinuo o un formato en columna. En el formato discontinuo, el líquido puede ponerse en contacto con la resina de HIC en un tanque con agitación fuerte. La separación de la resina de HIC del líquido puede facilitarse a continuación mediante sedimentación, o puede ayudarse de centrifugación. En el formato en columna, el cual se prefiere, el líquido se bombea preferiblemente a través de una columna a la que ya se ha añadido resina de HIC. Se prefieren los formatos en columnas ya que dan como resultado una mayor eficacia de adsorción. Este formato en columna podría contemplarse como formato en lecho “empaquetado” o “fijo”. Además, también pueden aplicarse contactores de “lecho expandido” o “lecho fluidificado”.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona un método para obtener fibrinógeno a partir de un fluido, comprendiendo el método:

5 (a) poner en contacto con una resina de cromatografía de interacción hidrófoba en condiciones en las que el fibrinógeno se une a la resina; y

(b) retirar la proteína unida mediante elución.

10 Cuando el fluido es leche o derivado de leche (preferible), el método según el cuarto aspecto de la invención va precedido opcionalmente de una etapa de método que comprende la purificación parcial del fibrinógeno a partir de la leche, comprendiendo el método precipitación de la proteína deseada en presencia de lisina o un análogo de lisina.

15 Todas las descripciones y detalles de las características de los aspectos primero a tercero también se aplican al cuarto.

La leche a partir de la cual va a purificarse parcialmente el fibrinógeno, se deriva preferiblemente de animales que pueden “criarse en granjas” con el fin de producir cantidades suficientes de leche a partir de la cual obtener proteínas farmacéuticas e incluyen oveja, vaca, cabras, conejo, camello, búfalo de agua, cerdo o caballo. Tales animales pueden ser claramente animales transgénicamente modificados. Preferiblemente, aunque no de manera exclusiva, la proteína transgénica se deriva de bovino o ser humano. Las proteínas derivadas de ser humano son preferibles ya que éstas, cuando se aíslan y purifican para uso farmacéutico a partir de la leche de una animal transgénico, es menos probable que provoquen una reacción inmunológica no deseada cuando se administran a un ser humano que las necesite con fines médicos. La presente invención no se refiere a seres humanos modificados de manera transgénica.

25 El sistema de activación del plasminógeno en la leche ha sido, durante varios años, un foco de interés. Se acepta de manera general que la leche contiene las enzimas primarias responsables de la fibrinólisis *in vivo*, por ejemplo, el activador de plasminógeno (tanto de tipo tisular, tPA, como de tipo urocinasa, uPA), plasminógeno y plasmina. A menudo se observa la acción de la proteólisis durante el almacenamiento de la leche o productos lácteos, en los que la caseína parece ser la proteína de la leche más susceptible a la degradación. Pronto se ilustró que en la leche, los activadores de plasminógeno, el plasminógeno y la plasmina se asociaban principalmente con las micelas de caseína y no en la fase de suero de la leche (o suero). El mecanismo por el cual estas moléculas se asocian con la caseína no se ha determinado categóricamente, pero es probable que estas moléculas contengan dominios Kringle (cadenas polipeptídicas estructuradas con una afinidad por aminoácidos básicos), estos dominios probablemente median en su interacción con la caseína. Heegaard *et al.*, 1997 (Plasminogen Activation System in Human Milk, Journal of Paediatric Gastroenterology and Nutrition, 25: 159-1166) han demostrado que la caseína inmovilizada sobre Sepharose puede unirse a tPA y, cuando la caseína está presente, la conversión de plasminógeno a plasmina catalizada por tPA se acelera. Esto parece sugerir que la yuxtaposición de la caseína, el plasminógeno y el tPA da como resultado el que se favorezca la activación del plasminógeno. El mecanismo que favorece la activación no está claro pero puede deberse a que el plasminógeno experimenta un cambio conformacional al unirse a la caseína dando como resultado una molécula que se activa más fácilmente con el tPA [Markus *et al.*, Casein, A Powerful Enhancer of the rate of Plasminogen Activation, Fibrinolysis 7: 229-236]. Por tanto, es evidente que un agente (tal como lisina o un análogo de lisina) añadido a la leche en una concentración suficiente disociará el tPA y la plasmina (el plasminógeno) de la caseína transfiriéndolos a la fase de suero de la leche.

45 Las consecuencias de esto es que la plasmina activa y el plasminógeno están presentes entonces en la misma fase que la de la proteína transgénica. En términos del fibrinógeno, tal como se trató anteriormente, el resultado de esto es que se producirá la proteólisis, especialmente de la cadena A α . Se conoce en la técnica que el ϵ ACA es relativamente ineficaz a la hora de inhibir la fibrinólisis primaria, es decir, la formación del fragmento X (F3) a partir de fibrinógeno o fibrina, y se ha postulado que la degradación inicial de fibrina puede producirse independientemente de la interacción no covalente de plasmina-fibrina (la cual está mediada por dominios Kringle en la unión de plasminógeno a aminoácidos básicos en la cadena A α de fibrinógeno), al contrario que las últimas etapas que dan como resultado la formación de fragmentos Y, D y E. De hecho, se ha demostrado [Francis *et al.*, Structural and Chromatographic. Heterogeneity of Normal Plasma Fibrinogen associated with the Presence of Three γ -chain types with Distinct Molecular Weights, Biochimica et Biophysica Acta, 744: 155-164] que la proteólisis de la cadena A α en las preparaciones comerciales de fibrinógeno avanza durante la separación cromatográfica en las subfamilias de fibrinógeno incluso con la inclusión de ácido ϵ -aminocaproico 20 mM y aprotinina (un potente inhibidor de proteasa) a 10 unidades de calicreína/ml. Por tanto, es evidente que la adición de ácido ϵ -aminocaproico durante la purificación de fibrinógeno humano a partir de la leche no tendría efectos beneficiosos, y los tendría incluso negativos.

60 Paradójicamente, se ha descubierto que el ácido ϵ -aminocaproico es una ayuda útil a la hora de evitar la degradación de fibrinógeno durante su purificación a partir de la leche si se incluye durante una fase con distribuciones de fibrinógeno, tal como una fase de precipitación. La similitud entre el fibrinógeno y la caseína en cuanto a la susceptibilidad a la precipitación, una técnica muy utilizada en la purificación de fibrinógeno a partir de plasma y crioprecipitado [por ejemplo, Schwarz *et al.*, patentes de los EE.UU. números 4.362.567, 4.377.572 y 4.414.976], y en la separación de la caseína a partir de leche [Swaigood. Developments in dairy Chemistry - 1: Chemistry of Milk Protein, Applied Science Publishers, NY, 1982], conduce a la precipitación conjunta de al menos parte de la fracción de caseína cuando se precipita fibrinógeno a partir de la leche utilizando agentes de precipitación bien conocida por los expertos en la técnica (por ejemplo, pero no exclusivamente, sales de zinc, cobre, sodio y amonio, aminoácidos (por ejemplo,

glicina, β -alanina), alcohol (por ejemplo, etanol) y polímeros (por ejemplo, polietilenglicol, dextrano o almidón de hidroxietilo). Incluso la adición de estos precipitantes en concentraciones relativamente bajas (por ejemplo sulfato de sodio y amonio al 5-20% p/v, glicina o β -alanina al 5-20% p/v; PEG al 2-15%) es suficiente para hacer precipitar fibrinógeno o una fracción mayoritaria del mismo también hace precipitar conjuntamente una fracción de la fase de caseína incluyendo algunas proteínas del suero de la leche. Esto puede reducirse si la precipitación se lleva a cabo más de una vez. La inclusión de ácido ϵ -aminocaproico o un análogo similar de lisina durante la fase de precipitación (a una concentración de 10-200 mM) da como resultado la disociación de proteínas que contienen dominios de kringle de la caseína y el fibrinógeno y las mantiene en fase de solución mientras que se hace precipitar el fibrinógeno. El método de protección del fibrinógeno es, por tanto, uno de exclusión. Entonces, el fibrinógeno precipitado puede reconstituirse en un tampón adecuado y no sólo es significativamente menos susceptible a la proteólisis, sino que también es significativamente más puro. Una técnica de este tipo funcionaría igualmente bien si se utiliza la temperatura como un método de precipitación. La ventaja añadida de esta invención es que el ácido ϵ -aminocaproico no sólo está evitando el daño proteolítico al fibrinógeno, si no que además no contamina el fibrinógeno precipitado ya que permanece en la fase de solución.

Un quinto aspecto de la presente invención proporciona fibrinógeno transgénico, al menos parcialmente purificado, que tiene una estabilidad mejorada, en particular con respecto a la proteólisis. Todas las características preferidas de los aspectos primero a cuarto de la invención también se aplican al quinto, aunque la proteína transgénica del quinto aspecto puede no tener por qué producirse necesariamente según el método de los aspectos primero a cuarto.

Se considera que todas las etapas de método individuales descritas en los aspectos primero a cuarto aumentan la estabilidad del fibrinógeno frente a la proteólisis.

Un sexto aspecto de la invención proporciona fibrinógeno, fibrinógeno 1 (F1), fibrinógeno 2 (F2), o una combinación de los mismos, que tiene unas cadenas $A\alpha$ de integridad elevada.

El séptimo aspecto de la invención proporciona fibrinógeno, fibrinógeno 1 (F1), fibrinógeno 2 (F2), o una combinación de los mismos, que puede obtenerse mediante un método según los aspectos primero a cuarto de la invención.

El fibrinógeno, fibrinógeno 1 y fibrinógeno 2 pueden obtenerse (teniendo cadenas $A\alpha$ de integridad elevada) en virtud de la etapa de HIC.

Tal como se ha descrito anteriormente, y se describirá a continuación en el presente documento, para el uso en selladores o adhesivos de fibrinógeno se prefiere particularmente el fibrinógeno 1 y/o fibrinógeno 2, según los aspectos sexto y séptimo de la invención.

Los aspectos quinto, sexto y séptimo de la invención producen preferiblemente fibrinógeno que está sustancialmente libre de contaminación vírica. Un fibrinógeno de este tipo puede producirse más fácilmente a partir de productos no sanguíneos, tales como los de la leche o la orina.

Un octavo aspecto de la invención proporciona fibrinógeno purificado que puede obtenerse según cualquiera de los aspectos primero a cuarto de la invención tal como se describió anteriormente. Todas las descripciones y detalles para los aspectos primero a séptimo, también se aplican al octavo.

El fibrinógeno según la invención puede estar en cualquier estado adecuado o conveniente, tal como un estado liofilizado o soluble.

Un noveno aspecto de la invención proporciona un sellador o adhesivo de fibrina que contiene fibrinógeno según los aspectos quinto a octavos de la invención. El sellador o adhesivo de fibrina según el noveno aspecto de la invención es, en todos los aspectos, con excepción del fibrinógeno particular utilizado, bien conocido y convencional en la técnica [Sierra, Fibrin Sealant Adhesive Systems: A Review of Their Chemistry, Material Properties and Clinical Applications, Journal of Biomaterials Applications, 7: 309-352, 1993; Martinowitz y Spotnitz, Fibrin Tissue Adhesives, Thrombosis and Haemostasis, 78: 661-666, 1997; Radosevich *et al.*, Fibrin Sealant Scientific Rationale, Production Methods, Properties and Current Clinical Use, Vox Sanguinis, 72: 133-143, 1997].

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “adhesivo de fibrina” o “sellador de fibrina” describe una sustancia que contiene fibrinógeno que puede formar un adhesivo o sellado biodegradable mediante la formación de fibrina polimerizada. Tales sistemas adhesivos/selladores se denominan alternativamente “adhesivos tisulares de fibrina” o “pegamentos tisulares de fibrina”. El adhesivo o sellado puede actuar como, entre otros, agente hemostático, una barrera frente a fluidos, una matriz de relleno del espacio o un agente de administración de fármaco. Un uso particular puede encontrarse en neurocirugía, cirugía oftálmica, ortopédica o cardiorráctica, injertos de piel y otros tipos de cirugía.

Además del fibrinógeno, el sellador o adhesivo de fibrina puede contener sustancias que estimulen la formación del adhesivo/sellado de fibrina, tal como trombina, Ca^{++} (por ejemplo, $CaCl_2$) y factor XIII (y/o factor XIIIa [en este texto, todas las referencias al factor XIII también son referencias al factor XIIIa y viceversa]). Aunque se reconozca que la trombina sería la enzima preferida con la que incorporarlo en cualquier sistema mediante el cual se desea la formación de un coágulo de fibrina, se aprecia que existen otras enzimas que pueden escindir proteolíticamente

ES 2 267 289 T3

el fibrinógeno dando como resultado la formación de un coágulo de fibrina. Un ejemplo de esto sería la enzima de veneno de serpiente batroxobina [Weisel y Cederholm-Williams, Fibrinogen and Fibrin: Characterization, Processing and Applications, Handbook of Biodegradable Polymers (Series: Drug targeting and Delivery) 7: 347-365, 1997]. Si se desea, también pueden incluirse otros componentes tales como albúmina, fibronectina, solubilizantes, agentes de carga y/u otros vehículos o diluyentes adecuados.

Una ventaja de un sellador de fibrina como un polímero biodegradable es que existen mecanismos naturales en el organismo para la eliminación eficaz de coágulos y por tanto, el sellador de fibrina puede ser un obturador temporal (“temporary plug”) para la hemostasia o la reparación de heridas. Diversas enzimas proteolíticas y células pueden disolver la fibrina dependiendo de las circunstancias, pero el mecanismo más específico implica el sistema fibrinolítico. La solución de coágulos de fibrina, en condiciones fisiológicas, implica la unión del plasminógeno circulante a la fibrina, y la activación del plasminógeno a la proteasa activa, plasmina, mediante los activadores de plasminógeno que también pueden estar unidos a la fibrina. Entonces la plasmina escinde la fibrina en sitios específicos.

Dependiendo de la situación, puede ser ventajoso dejar que el proceso natural de la descomposición de la fibrina tenga lugar tras la aplicación en un sitio de un adhesivo o sellador de fibrina. De hecho, puede estimularse esta descomposición, por ejemplo, mediante la inclusión de plasminógeno.

Alternativamente, en algunas situaciones puede ser ventajosos retrasar el proceso incluyendo compuestos antifibrinolíticos que puedan, por ejemplo, bloquear la conversión de plasminógeno en plasmina o unirse directamente al sitio activo de la plasmina para inhibir la fibrinólisis. Tales antifibrinolíticos incluyen α_2 -macroglobulina, que es un inhibidor fisiológico primario de la plasmina; aprotinina; α_2 -antiplasmina; y ácido ϵ -aminocaproico.

El sellador de fibrina puede comprender dos componentes, conteniendo un componente fibrinógeno y factor XIII (y/o factor XIIIa) y conteniendo el otro componente trombina y Ca^{++} . Si se desea pueden incluirse otras sustancias, tal como se describió anteriormente, a uno o a ambos componentes.

Un décimo aspecto de la invención proporciona un kit para un adhesivo o sellador de fibrina que comprende fibrinógeno según uno cualquiera de los aspectos cuarto a octavo de la invención, y las instrucciones de uso o, puede comprender fibrinógeno según uno cualquiera de los aspectos cuarto a octavo de la invención en combinación con (pero no necesariamente mezclado con) uno o más de: factor XIII, factor XIIIa, trombina o Ca^{++} . Además, el kit puede comprender dos componentes: fibrinógeno con (pero no necesariamente mezclado con) factor XIII (y/o factor XIIIa) y trombina con (pero no necesariamente mezclada con) Ca^{++} .

Los componentes de cualquier sellador de fibrinógeno, según la presente invención, incluyendo las formas de los kit, pueden utilizarse separada, simultánea o secuencialmente.

Todas las descripciones y detalles relevantes con respecto a los aspectos primero a noveno de la invención también se aplican al décimo.

Un undécimo aspecto de la invención proporciona un método para la producción de un sellador o adhesivo de fibrina según el noveno aspecto de la invención, que comprende mezclar fibrinógeno con trombina o cualquier otro enzima que puede modificar proteolíticamente el fibrinógeno y hacer que éste coagule. En este aspecto de la invención, también pueden mezclarse el factor XIII (y/o factor XIIIa) y el Ca^{2+} con el fibrinógeno y la trombina (u otra enzima adecuada).

El método de combinar fibrinógeno y trombina puede implicar la aplicación de un chorro o la pulverización de los componentes de manera simultánea o secuencial en el sitio de reparación con una jeringuilla o un dispositivo relacionado. La mezcla puede resultar de dos jeringuillas mantenidas juntas a lo largo de sus cuerpos y en los émbolos con dos componentes mezclados bien tras salir de las agujas o en el núcleo justo anterior a la salida. Pueden utilizarse otros dispositivos para producir un aerosol o para pulverizar en un patrón variable, dependiendo de la aplicación.

Aunque durante algún tiempo se han utilizado diversos derivados de fibrinógeno en aplicaciones clínicas, existen diversos problemas de seguridad implicados en el uso clínico del fibrinógeno tal como la inquietud por una contaminación vírica, especialmente con productos que contienen fibrinógeno o componentes preparados a partir de sangre humana especialmente sangre humana combinada. Aunque, desde que sacó a la luz el temor a la transmisión de virus patógenos, se han hecho mejoras en las técnicas de limpieza de virus para hemoderivados, de manera que se ha reducido en gran medida el riesgo de transmisión de enfermedades, el riesgo no se ha eliminado totalmente. La presente invención, que se refiere al fibrinógeno obtenido a partir de la leche o la orina, puede estar sustancialmente libre de tales inquietudes.

Un doceavo aspecto de la invención proporciona fibrinógeno, según los aspectos cuarto a octavo de la invención, de uso en medicina. Preferiblemente, el fibrinógeno se utiliza en medicina humana. Sin embargo, también puede utilizarse en medicina veterinaria, tal como para caballos, cerdos, ovejas, vacas, ganado, conejos, ratones y ratas, así como para mascotas domésticas tales como perros y gatos.

Aunque el uso principal del fibrinógeno está pesando para la preparación de agentes adhesivos o selladores tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, el fibrinógeno tiene otras aplicaciones en el campo de

la medicina, por ejemplo, como recubrimiento para artículos poliméricos tal como se describe en la patente de los EE.UU. nº 5.272.074. Un uso particular de fibrinógeno liofilizado de la presente invención es dentro de o como parte de una gasa o vendaje (fabricado preferiblemente a partir de compuestos de poli(ácido láctico) utilizado en suturas quirúrgicas). Un revestimiento para heridas de este tipo puede facilitarse (incorporando además los otros componentes necesarios para la formación de un coágulo (descritos anteriormente) opcionalmente en un envase o en forma de kit, para la aplicación directa a la piel o a un órgano interno. Todos los detalles y características de los aspectos previamente tratados, también se aplican al doceavo.

Un treceavo aspecto de la invención proporciona un adhesivo o sellador de fibrina, según el aspecto noveno de la invención, de uso en medicina.

El uso en medicina puede ser cualquiera de los descritos en el presente documento. Todos los detalles y características de los aspectos primero a undécimo, también se aplican al treceavo.

Un catorceavo aspecto de la presente invención proporciona un método de cirugía o tratamiento que comprende la colocación de fibrinógeno según los aspectos cuarto a octavo de la invención sobre o dentro de un animal o una parte del cuerpo de un animal. El animal en cuestión, preferiblemente, lo necesita. El animal, preferiblemente, es un ser humano. El fibrinógeno puede mezclarse con uno o más de trombina, factor XIII, factor XIIIa o Ca^{2+} separada, secuencial o simultáneamente al fibrinógeno. El fibrinógeno puede estar, por tanto, en forma de un sellador según el noveno aspecto de la invención. El fibrinógeno puede aplicarse mediante aplicación de un chorro utilizando una jeringuilla o un dispositivo relacionado. Puede aplicarse de manera muy precisa en un área localizada o de manera amplia sobre un área grande de cualquier tejido. Todos los detalles y características preferidas de los aspectos uno a treceavo también se aplican al catorceavo.

Un quinceavo aspecto de la invención proporciona el uso de fibrinógeno, según los aspectos cuarto a octavo de la invención en la fabricación de un adhesivo o sellador de fibrina.

En esta invención, se logra la purificación de fibrinógeno o una etapa opcional preferida mediante el uso de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) que se lleva a cabo de tal manera que permite no sólo la separación de las proteínas de la leche, conduciendo a un producto sustancialmente puro, sino también al fraccionamiento simultáneo del fibrinógeno en F1, F2 y productos de degradación. En general, el fibrinógeno, preferiblemente purificado de manera parcial mediante precipitación, se pone en contacto con una resina HIC (por ejemplo, Butyl Sefarosa™) en condiciones en las que se retiene el fibrinógeno (por ejemplo, sulfato de amonio 0,2-0,8 M, preferiblemente de 0,3 a 0,6 M). A continuación, la resina se lava, bien de modo discontinuo mediante centrifugación o bien mediante inclusión en una columna de cromatografía. La elución del material unido se facilita disminuyendo la concentración de sal (por ejemplo sulfato de amonio en concentración decreciente de 0,5 a 0 M) en una fase móvil de manera que se logra la resolución de fibrinógeno de los componentes distintos al fibrinógeno. Mediante una selección cuidadosa de la concentración de sal, el fibrinógeno no sólo se separa de la mayoría de los componentes de la leche, sino que también puede fraccionarse en subfamilias. La elución puede llevarse a cabo o bien utilizando un gradiente decreciente mediante el cual la pendiente del gradiente determina la resolución o bien, de manera más conveniente, mediante el uso de una serie de etapas decrecientes de concentración. El uso de la HIC permite que se defina el producto de fibrinógeno con respecto a su región C-terminal de $A\alpha$.

El sistema de activación del plasminógeno en la leche ha sido, durante varios años, un foco de interés. Se acepta de manera general que la leche contiene las enzimas primarias responsables de la fibrinólisis *in vivo*, por ejemplo, el activador de plasminógeno (tanto de tipo tisular, tPA, como de tipo urocinasa, uPA), plasminógeno y plasmina. A menudo se observa la acción de la proteólisis durante el almacenamiento de la leche o productos lácteos, en los que la caseína parece ser la proteína de la leche más susceptible a la degradación. Pronto se ilustró que en la leche, los activadores de plasminógeno, el plasminógeno y la plasmina se asociaban principalmente con las micelas de caseína y no en la fase de suero de la leche (o suero). El mecanismo por el cual estas moléculas se asocian con la caseína no se ha determinado categóricamente, pero es probable que ya que estas moléculas contienen dominios Kringle (cadenas polipeptídicas estructuradas con una afinidad por aminoácidos básicos), estos dominios probablemente median en su interacción con la caseína.

Se entiende que la proteólisis de la proteína humana puede producirse dentro de la glándula mamaria o ubre del animal transgénico lactante. El periodo de incubación de la proteína transgénica en la glándula mamaria o ubre puede aproximarse al periodo de tiempo entre los ordeños del animal. Por tanto, es evidente que el aumento de la frecuencia de los ordeños minimiza este periodo de tiempo. Sin embargo, el aumento de la frecuencia de ordeño por encima de los 3 o 4 ordeños diarios, no sólo crea una medida de discontinuidad para el animal, sino que implica un coste adicional a los gastos de la industria láctea. Se acepta, por tanto, que se producirá una medición de la degradación del fibrinógeno humano. Tal como se trató en la técnica anterior, la presencia de los productos de degradación del fibrinógeno en un adhesivo tisular de fibrina compromete la utilidad del producto, y por tanto, debe extraerse cualquier producto de degradación. Esta invención describe cómo los inventores han descubierto una manera extremadamente eficaz de lograr esto que también permite seleccionar y definir la razón de fibrinógeno F1 y F2 en el producto final.

Las técnicas para la separación del fibrinógeno del plasma en sus diversas subfracciones, tal como se describe en la técnica anterior, caen generalmente en dos categorías. Las que se basan en la solubilidad diferencial de las subfracciones en concentraciones de sales elevadas (por ejemplo, sulfato de amonio y glicina), a menudo denominadas

técnicas de precipitación selectiva [Holm *et al.*, Purification and Characterisation of 3 Fibrinogens with different molecular weights obtained from normal human plasma, *Thrombosis research*, 37: 165-176, 1985], y las que aprovechan el hecho de que los productos de degradación tienen un tamaño molecular diferente y pueden, por tanto, separarse utilizando cromatografía de exclusión por tamaño.

5

Las dos categorías de técnicas descritas anteriormente son bastante opuestas en cuanto a sus posibilidades y facilidades de uso para el subfraccionamiento de fibrinógeno a escala industrial. Mientras las técnicas de precipitación son relativamente fáciles de manejar y ampliar en escala, su modo inherente de separación no permite los niveles extremadamente elevados de resolución que serían necesarios para garantizar que el fibrinógeno producido podría definirse de manera precisa con respecto a su razón de F1:F2 y por tanto la integridad de la cadena A α . En efecto defensores de esta técnica a escala de laboratorio informan a menudo de la contaminación de las subfracciones entre sí [Lipinska *et al.*, Fibrinogen Heterogeneity in Human Plasma: Electrophoretic demonstration and characterization of two major fibrinogen components, *Journal of Laboratory & Clinical Chemistry*, 84: 509-516, 1974] y de los bajos rendimientos.

10

Al contrario que las técnicas basadas en la solubilidad diferencial, la cromatografía de exclusión por tamaño puede dar como resultado de manera potencial una resolución muy buena de las subfracciones de fibrinógeno con un alto rendimiento. Los principales inconvenientes de esta técnica son los gastos y la escala. Aunque el fibrinógeno F1 y F2 y el F2 y F3 difieren por unos 35-40 kdal, el tamaño de la molécula en sí misma (340 kdal) está próximo al límite del intervalo de fraccionamiento de la mayoría de las matrices de exclusión por tamaño. Esto da como resultado una mala resolución si no se utilizan resinas caras. Otra limitación es la escala, ya que la SEC (Size Exclusion Chromatography - Cromatografía de exclusión por tamaño) no es una técnica cromatográfica favorecida en el aumento de escala del proceso cuando tienen que llevarse a cabo separaciones sutiles. Además, normalmente la SEC es una técnica muy cara ya que sólo podría cargarse una pequeña fracción de un volumen de material de la columna al mismo tiempo que se mantuviera la resolución.

25

La cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) es una técnica de separación que aprovecha la unión de las proteínas a resinas ligeramente hidrófobas en presencia de concentraciones bajas de sales que exponen parches hidrófobos sobre la superficie de las proteínas. En presencia de las sales denominadas “formadoras de estructuras”, pueden iniciarse interacciones selectivas entre las diferentes proteínas y la matriz. La técnica se utiliza con mayor frecuencia para discriminar entre las distintas proteínas en una mezcla heterogénea. Los inventores han descubierto que la HIC no sólo es una muy buena técnica de fraccionamiento para la recuperación de fibrinógeno a partir de un extracto parcialmente purificado, sino que también es una técnica sorprendentemente potente para resolver las subfracciones de fibrinógeno, es decir, F1, F2, F3 (fragmento X), fragmento Y y fragmentos D y E.

30

El fibrinógeno humano transgénico, parcialmente purificado a partir de la leche se une a las resinas HIC (por ejemplo, pero no exclusivamente, Butyl Sefarosa[®]4FF, Amercham Pharmacia Biotechnology) en presencia de sulfato de amonio u otra sal “formadora de estructuras” a una concentración que permite que el fibrinógeno se una, por ejemplo, se utiliza un intervalo de 0,2-1,0 M (preferiblemente, de 0,3-0,6 M). Disminuyendo la concentración de sulfato de amonio en el tampón de irrigación, el material unido eluye desde la columna en orden componentes de la leche (sulfato de amonio 0,485-0,37 M), fibrinógeno F1 (sulfato de amonio 0,37-0,2 M), fibrinógeno F2 (sulfato de amonio 0,2-0,14 M), y fibrinógeno F3 y productos de degradación (sulfato de amonio 0,10-0,0 M). El intervalo de concentraciones de sulfato de amonio por encima del cual los componentes unidos eluyen se determina, en parte, mediante las condiciones de funcionamiento y los expertos en la técnica podrían ajustar bien la temperatura o bien el pH o bien ambos para cambiar las concentraciones de sulfato de amonio sobre las cuales eluyen las fracciones. Usando esta técnica es posible, mediante una elución en gradiente o más preferiblemente mediante una serie de etapas, predeterminar y por tanto definir el fibrinógeno que se eluye desde la columna en términos de su razón de F1 con respecto a F2 y por tanto la integridad de su cadena A α .

35

40

45

Este texto se refiere a las figuras adjuntas de las cuales:

50

La figura 1 es un SDS-PAGE de fibrinógeno purificado parcialmente del ejemplo A, en ausencia o en presencia de ϵ ACA.

La figura 2 es un cromatograma que ilustra las diversas fracciones generadas desde la columna de HIC en el ejemplo 1. El cromatograma se generó utilizando UV a 280 nm.

55

La figura 3 es un SDS-PAGE de la elución de fibrinógeno humano transgénico desde la columna de HIC (Butyl Sefarosa 4FF) en el ejemplo 1.

La figura 4 es un SDS-PAGE de la elución de fibrinógeno humano transgénico desde la columna de HIC (Butyl Sefarosa 4FF) en el ejemplo 2.

60

La figura 5 es un cromatograma que ilustra las diversas fracciones generadas desde la columna HIC en el ejemplo 2. El cromatograma se generó utilizando UV.

65

Las figuras 6, 7, 8 y 9 son cromatogramas de RP-HPLC para el fibrinógeno y las fracciones de fibrinógeno eluidas desde la columna de HIC utilizando las condiciones esbozadas en los ejemplos 1 y 2. Los cromatogramas se generaron utilizando una longitud de onda de 214 nm.

ES 2 267 289 T3

Los siguientes ejemplos no limitantes ayudan a ilustrar esta invención.

Ejemplo A

5 Se descongeló leche de una oveja transgénica desde un estado congelado en un baño de agua a 37°C y, a continuación, se eliminaron los lípidos mediante una centrifugación a baja velocidad (2000 rpm) durante 10 minutos. A continuación, la leche desnatada se preparó en alícuotas en 2 fracciones 40 ml y se procesaron tal como sigue. A una de las fracciones se le añadieron 40 ml de sulfato de amonio al 27,6% (p/v) en citrato 25 mM, ϵ ACA 100 mM, pH 8,0. El tubo se mezcló durante 20 minutos a temperatura ambiente seguido de una centrifugación a alta velocidad en una
10 centrífuga Beckman J2-21 (15°C). Se eliminó el sobrenadante generado y el sedimento se disolvió en citrato 25 mM, pH 8,0. Una vez que se disolvió hasta los 40 ml, se repitió la precipitación y resolubilización tal como anteriormente. A continuación, se llevó a cabo una etapa final de precipitación y resolubilización final, esencialmente tal como anteriormente excepto en que se omitió el ϵ ACA de la solución de sal. A continuación, se repitió el mismo procedimiento anterior en la segunda alícuota de 40 ml de leche desnatada excepto que no se utilizó ϵ ACA.

15 La electroforesis en gel dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE al 8-16%, Novex) mostrada en la figura 1 ilustra la estabilidad del fibrinógeno purificado parcialmente. El carril 1 representa fibrinógeno parcialmente purificado en presencia de ϵ ACA y almacenado a 4°C durante la noche. Puede observarse que el fibrinógeno es, predominantemente, F1:F2. El producto de degradación, fragmento X (F3) también está presente como una banda que migra más rápido por debajo de las bandas de F1:F2. El carril 2 representa material almacenado a 4°C purificado tal como en el carril 1 excepto en que el ϵ ACA estuvo ausente durante la fase de precipitación. Desde el carril 1 y el carril 2, es evidente que algo de fibrinógeno F1 se ha escindido de manera proteolítica durante el almacenamiento a 4°C. El carril 3 representa material como en el carril 1 excepto en que el almacenamiento fue a 18°C durante la noche. Tal como puede observarse este material parece ser más estable que el mostrado en el carril 2 y, de hecho,
20 es muy similar al mostrado en el carril 1. El carril 4 representa material purificado en ausencia de ϵ ACA después de un almacenamiento durante la noche a 18°C. Es evidente que este material se ha dañado gravemente, y prácticamente carece de fibrinógeno F1. Este ejemplo sirve para ilustrar que el fibrinógeno, purificado parcialmente a partir de la leche mediante precipitación, es inestable frente a la acción proteasa de la leche. Esta acción proteasa puede disminuirse mediante incubación a 4°C, pero se suprime si la precipitación se lleva a cabo en presencia de ϵ ACA que evita la contaminación del fibrinógeno precipitado con proteasa de la leche.

Ejemplo 1

35 Se purificó parcialmente fibrinógeno transgénico a partir de la leche de una oveja transgénica mediante precipitación con sulfato de amonio, de una manera similar a la descrita en el ejemplo A. Se llevaron 2 ml hasta sulfato de amonio 0,485 M mediante la adición de sulfato de amonio 1,45 M en citrato 5 mM, pH 7:5 (1 ml). Tras el mezclado, la solución se bombeó sobre una columna HiTrap Butyl Sepharose® 4FF (previamente equilibrada con sulfato de amonio 0,485 M, en tampón citrato 25 mM, pH 7,5) a 0,1 ml/min. La columna se lavó con 2 volúmenes de columna de sulfato de amonio 0,485 M en citrato 5 mM, pH 7,5 tras lo cual se llevó a cabo la elución en 3 etapas 1) sulfato de amonio 0,40 M en citrato 5 mM, pH 8,0, 2) sulfato de amonio 0,15 M en tampón citrato 5 mM, pH 8,0, 3) citrato 5 mM, pH 8,0. El cromatograma presentado a continuación como figura 2 muestra que los 4 picos principales se obtuvieron a partir de este experimento. El primer pico representa material que no se una a la columna en estas condiciones de adsorción y son fundamentalmente proteínas de la leche de oveja. El segundo pico representa material que no se unió a la columna y eluyó con sulfato de amonio 0,40 M. El tercer pico representa fibrinógeno y fracciones tomadas a través de éste se muestran en un SDS-PAGE como figura 3. La clara distinción entre F1 (fibrinógeno de alto peso molecular) y F2 (fibrinógeno de bajo peso molecular) y la resolución obtenida en la cromatografía puede observarse claramente (carriles 1-5). El carril 6 representa el pico colectivo, mientras que los carriles 7 y 8 representan el pico 4 del cromatograma que puede observarse como que es fibrinógeno F3” (fragmento X). Por tanto es evidente que cambiando la concentración de sulfato de amonio utilizado para elución es posible definir el fibrinógeno eluido con respecto a la integridad de su
45 50 cadena A α .

Ejemplo 2

55 En otro ejemplo que ilustra el aumento de escala potencial de esta técnica, un procedimiento equivalente al ejemplo 1 anterior se aumentó en escala en un factor de 400. Así, se purificaron parcialmente 0,9 g (790 ml) de fibrinógeno humano transgénico mediante precipitación en presencia de ácido ϵ -aminocaproico 50 mM. A continuación se llevó hasta sulfato de amonio 0,5 M mediante la adición de 790 ml de sulfato de amonio 1 M en tampón citrato pH 7,5. Este material se cargó sobre una columna 5 cm x 21 cm (4,00 ml) de Butyl Sepharose 4FF a una velocidad de flujo de 20 ml/min. Tras la carga, la columna se lavó con 400 ml de sulfato de amonio 0,5 M en tampón citrato 5 mM, pH 7,5. El material unido se eluyó de la columna mediante irrigación con tres tampones 1) sulfato de amonio 0,4 M en citrato 5 mM, pH 7,5, 800 ml 2) sulfato de amonio 0,15 M en tampón citrato 5 mM, pH 7,5, 800 ml, y 3) citrato 5 mM, pH 7,5, 800 ml.

65 El SDS-PAGE y cromatograma mostrados como las figuras 4 y 5, respectivamente, muestran los resultados de este experimento. Tal como puede observarse en el SDS-PAGE, se eluyó fibrinógeno F1:F2 de la columna mediante sulfato de amonio 0,15 M (carriles 3-4, figura 4) mientras que se eluyó fibrinógeno F3 utilizando un cambio de etapa a citrato 5 mM, pH 7,5 que no contiene sulfato de amonio (carril 8, figura 4). El SDS-PAGE reductor es una manera conveniente de determinar la integridad de la cadena A α ya que la pérdida de regiones C-terminales de A α da como resultado una

disminución en el peso molecular de la cadena $A\alpha$. Esta disminución se valora de manera cualitativa fácilmente. En la figura 4, el carril 6 muestra un fibrinógeno F1:F2 reducido con ditiotreititol 10 mM como agente reductor. Cuando esto se compara con fibrinógeno F3 (carril 8), se observa claramente la pérdida de la cadena $A\alpha$.

5 Puede obtenerse información cuantitativa en la integridad de la cadena $A\alpha$ mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución en fase invertida (RP-HPLC) sobre el fibrinógeno reducido según Raut *et al.*, [Ultra-rapid preparation of milligram quantities of the purified polypeptide chains of human fibrinogen, Journal of Chromatography B, 660: 390-394, 1994] que permite la integración de áreas de pico. La figura 6 muestra un cromatograma de RP-HPLC para fibrinógeno F purificado; las tres cadenas de fibrinógeno eluyen de la columna en el orden $A\alpha$, $B\beta$ y γ respectivamente; tal como puede observarse, existe un único pico para cada cadena. La integración de la cadena $A\alpha$ da como resultado un área de pico que se utiliza como un patrón frente al cual puede normalizarse el fibrinógeno con cadenas $A\alpha$ degradadas. En la figura 7, se muestra un cromatograma de RP-HPLC, llevado a cabo en condiciones idénticas a las de la figura 6, para fibrinógeno F2 en el que es evidente que el pico de $A\alpha$ se ha separado en dos picos, siendo el primero cadena $A\alpha$ intacta y el segundo el último cadena $A\alpha$ escindida de manera proteolítica en el extremo carboxilo. Utilizando una integración en línea puede calcularse que la cadena $A\alpha$ existe en un 73% como intacta, siendo el 27% restante cadena $A\alpha$ degradada. En la figura 8 se muestra un cromatograma RP-HPLC para fibrinógeno F3. En este cromatograma es evidente que la cantidad de $A\alpha$ degradada tiene mucho más peso que la cantidad de cadena $A\alpha$ no degradada, tal como se ilustra por el muy reducido pico de cadena $A\alpha$ no degradada. Puede calcularse que la cadena $A\alpha$ degradada representa un 62% del total de la cadena $A\alpha$ presente.

20 Es evidente, por tanto, que la utilización de la técnica de RP-HPLC, como una herramienta analítica tras la cromatografía de interacción hidrófoba, permite seleccionar las condiciones de la cromatografía de interacción hidrófoba para preparar fibrinógeno con una integridad de cadena $A\alpha$ definida. Un ejemplo de esto se da en la figura 9 que representa la elución a partir de la columna de Butyl Sefarosa 4FF utilizando las condiciones esbozadas en el ejemplo 2 anterior. A partir del cromatograma de la figura 9, es evidente que se selecciona principalmente fibrinógeno F1 ya que la cadena $A\alpha$ está intacta en un 87%.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 267 289 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la purificación parcial de fibrinógeno a partir de la leche, comprendiendo el método la transferencia de enzima proteasa que está presente en la leche, hacia la fase de suero de la leche con la extracción o distribución del fibrinógeno hacia otra fase de la leche.
- 10 2. Método para la purificación parcial del fibrinógeno, comprendiendo el método precipitación de la proteína deseada en presencia de lisina o un análogo de lisina.
- 10 3. Método, según la reivindicación 2, en el que el método se sigue opcionalmente mediante una etapa de método que comprende:
- 15 (a) poner en contacto el fibrinógeno purificado parcialmente con una resina de cromatografía de interacción hidrófoba en condiciones en las que el fibrinógeno se une a la resina; y
- (b) extraer la proteína unida mediante elución.
- 20 4. Método para la obtención de fibrinógeno a partir de la leche, método que comprende:
- (a) poner en contacto la leche con una resina de cromatografía de interacción hidrófoba en condiciones en las que el fibrinógeno se une a la resina; y
- (b) extraer la proteína unida mediante elución.
- 25 5. Método para la obtención de fibrinógeno a partir de la leche, comprendiendo el método:
- (a) la transferencia de la enzima proteasa que está presente en la leche, hacia la fase de suero de la leche con la extracción o distribución del fibrinógeno hacia otra fase de la leche;
- 30 (b) puesta en contacto de la leche con una resina de cromatografía de interacción hidrófoba en condiciones en las que el fibrinógeno se une a la resina; y
- (c) extracción de la proteína unida mediante elución,
- 35 6. Método para la obtención de fibrinógeno a partir de la leche, comprendiendo el método:
- (a) la precipitación del fibrinógeno en presencia de lisina o un análogo de lisina;
- 40 (b) puesta en contacto del fluido con una resina de cromatografía de interacción hidrófoba en condiciones en las que el fibrinógeno se une a la resina; y
- (c) extracción de la proteína unida mediante elución,
- 45 7. Método, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5, en el que la enzima proteasa es plasmina y/o plasminógeno.
8. Método, según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 o 7, en el que la extracción o distribución de la proteína deseada es mediante precipitación.
- 50 9. Método, según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 o 7, en el que la transferencia de la enzima proteasa hacia la fase de suero de la leche es mediante la presencia de lisina o un análogo de lisina.
- 55 10. Método, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la leche es leche entera, leche desnatada o una fracción de leche.
11. Método, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la leche es leche que se deriva de una oveja, vaca, cabra, conejo, camello, búfalo de agua, cerdo o caballo.
- 60 12. Método, según la reivindicación 11, en el que el fibrinógeno se deriva de bovino o humano.
13. Método, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o 7 a 12 (cuando se depende de las reivindicaciones 1 a 3), en el que la proteína parcialmente purificada se purifica adicionalmente repitiendo la primera etapa de cada método de purificación.
- 65 14. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, o 10 a 13 (cuando se depende de las reivindicaciones 3 a 6), que permite el aislamiento de fibrinógeno que tiene una razón de fragmento F1 con respecto a F2 predeterminada.

ES 2 267 289 T3

15. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, o 10 a 13 (cuando se depende de las reivindicaciones 3 a 6), que permite el aislamiento de fibrinógeno que tiene una integridad de cadena A seleccionada previamente.

5 16. Fibrinógeno transgénico que tiene una razón de fragmento F1 con respecto a fragmento F2 predeterminada, que puede obtenerse a partir de la leche, purificado al menos parcialmente, que tiene una estabilidad mejorada (en particular con respecto a la proteólisis) y/o una mayor integridad de la cadena alfa de fibrinógeno.

10 17. Fibrinógeno transgénico que tiene una razón de fragmento F1 con respecto a fragmento F2 predeterminada, que puede obtenerse mediante un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

18. Fibrinógeno transgénico que tiene una integridad de cadena A seleccionada previamente.

15 19. Fibrinógeno transgénico, según la reivindicación 17, en el que el fibrinógeno comprende al menos un 80% de fibrinógeno F1.

20 20. Fibrinógeno transgénico, según las reivindicaciones 15 a 19, sustancialmente libre de contaminación vírica.

21. Fibrinógeno transgénico, según las reivindicaciones 15 a 20, que comprende fibrinógeno 1, fibrinógeno 2 o una combinación de los mismos.

22. Adhesivo o sellador de fibrina que contiene fibrinógeno según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21.

23. Adhesivo o sellador de fibrina, según la reivindicación 22, que contiene trombina, Ca^{++} y factor XIII.

25 24. Kit para adhesivo o sellador de fibrina, que comprende fibrinógeno según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23, junto con factor XIII y/o factor XIIIa como un componente y trombina y Ca^{++} como un segundo componente.

30 25. Método para producir adhesivo o sellador de fibrina, según la reivindicación 22 o 23, que comprende la combinación de fibrinógeno con trombina.

26. Fibrinógeno, según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, de uso en medicina.

27. Adhesivo o sellador de fibrina, según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, de uso en medicina.

35 28. Uso de fibrinógeno, según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, en la fabricación de un adhesivo o sellador de fibrina.

40

45

50

55

60

65

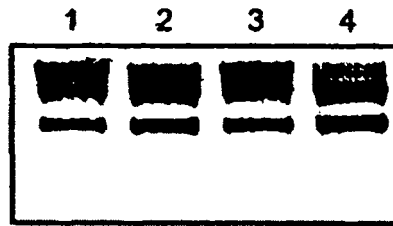


FIG. 1

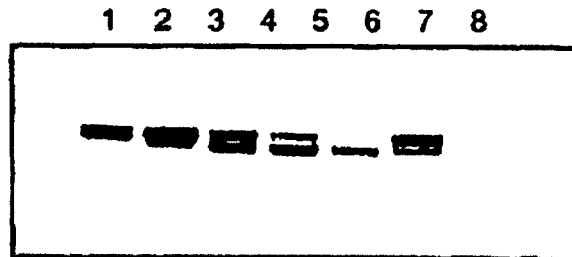


FIG. 3

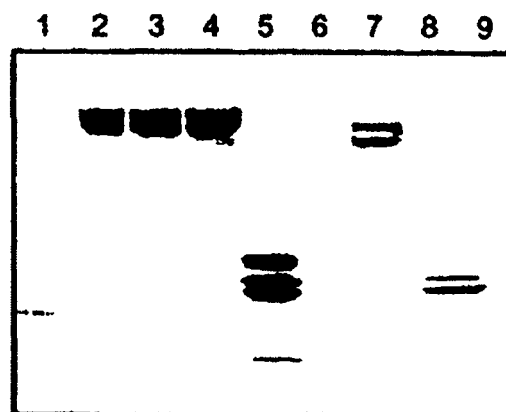


FIG. 4

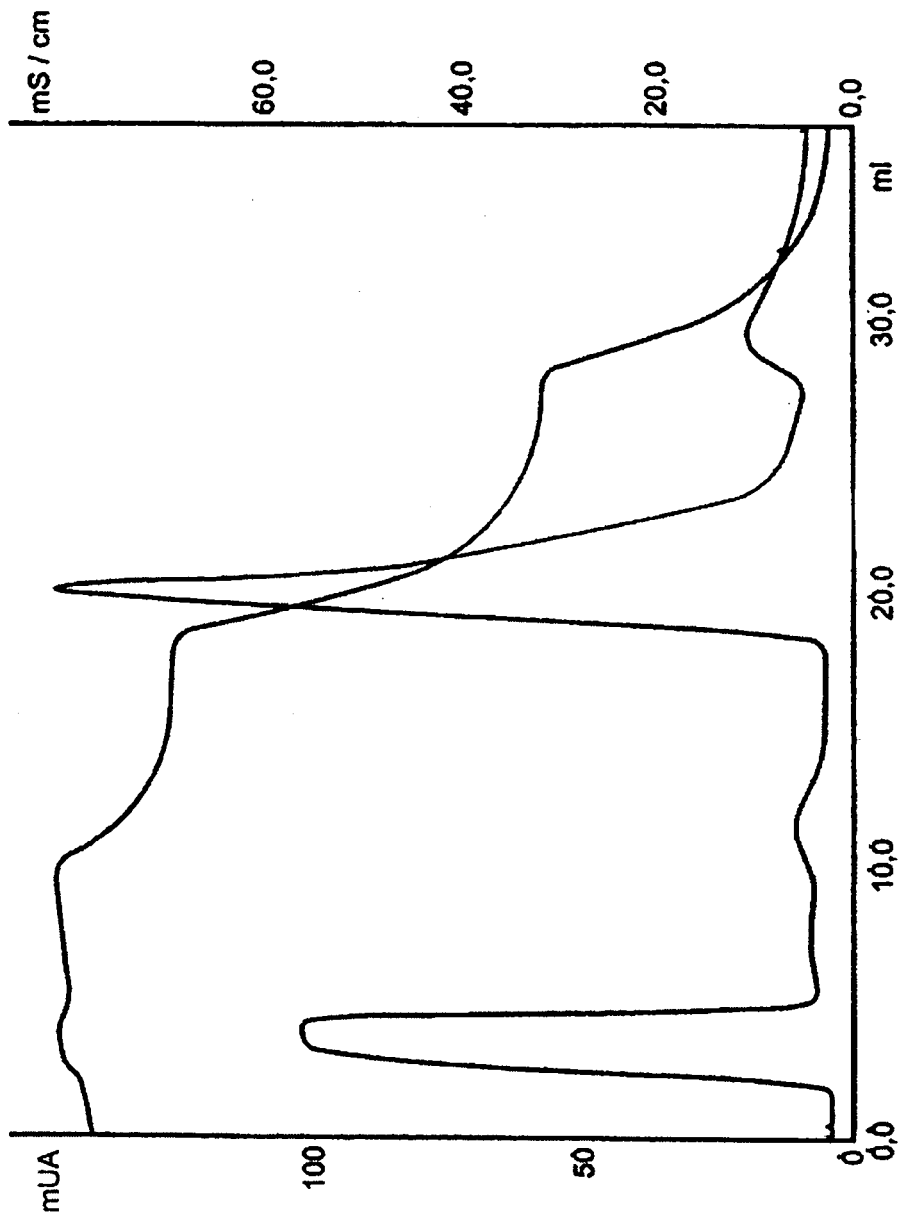


FIG. 2

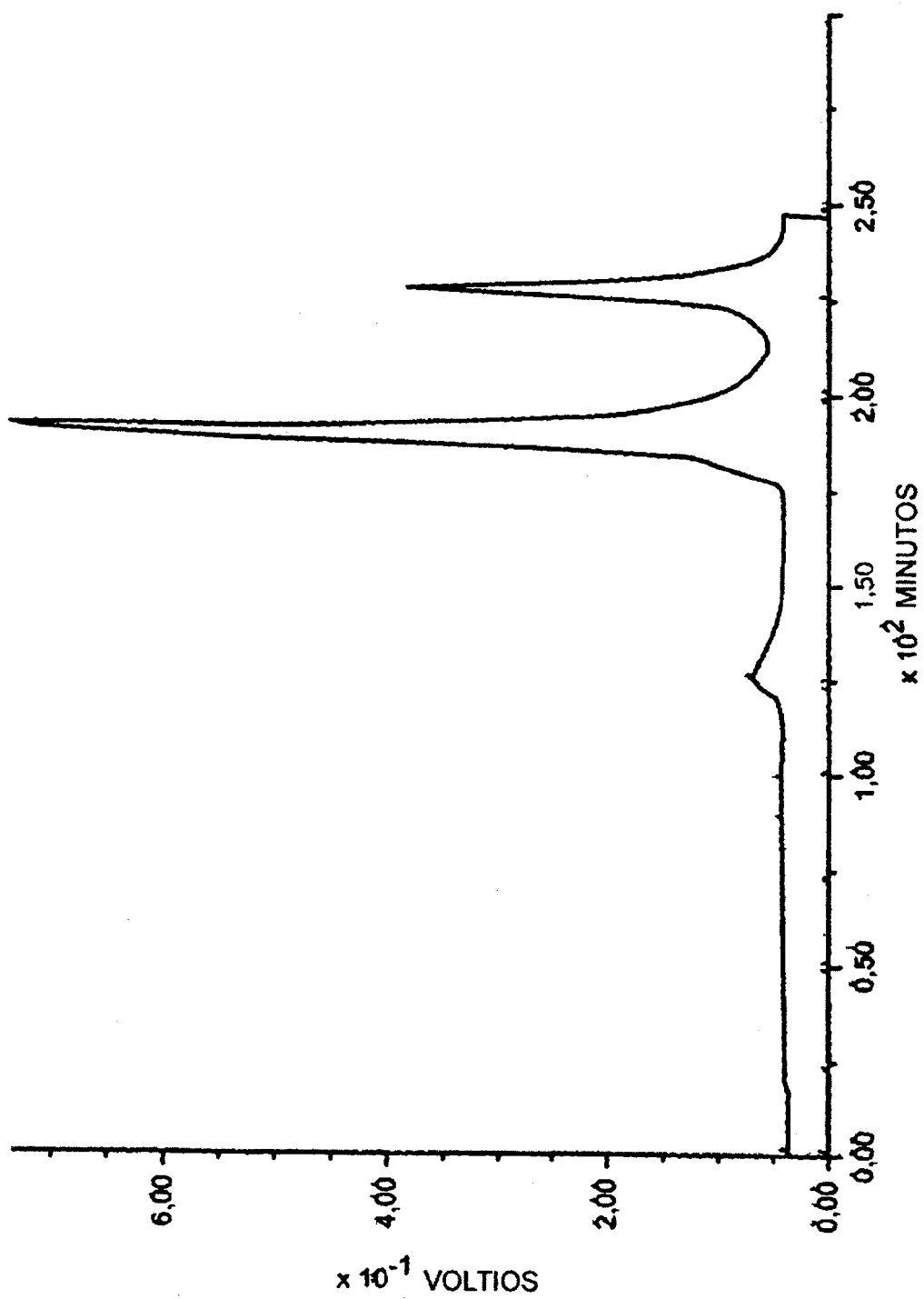


FIG. 5

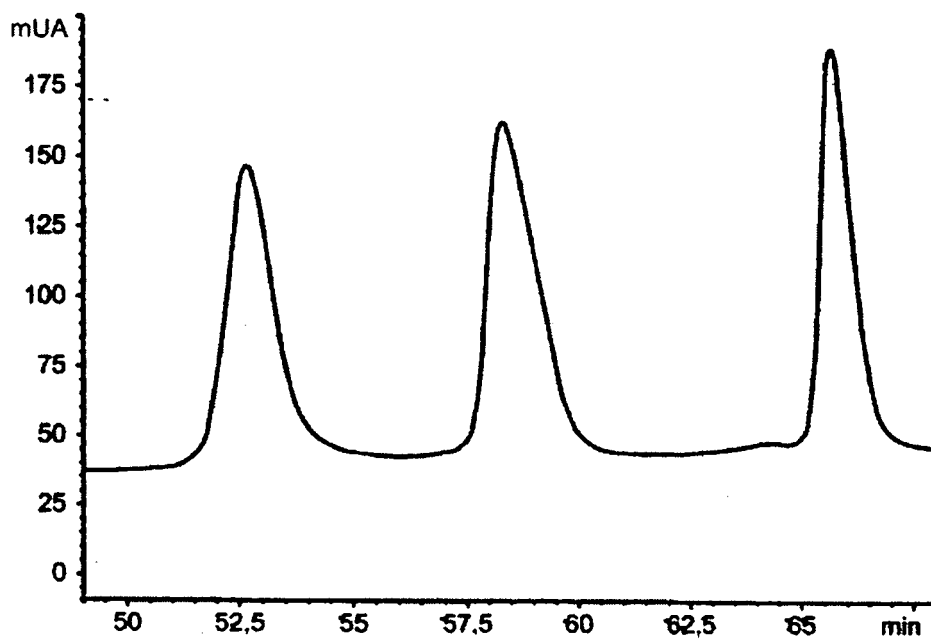


FIG. 6

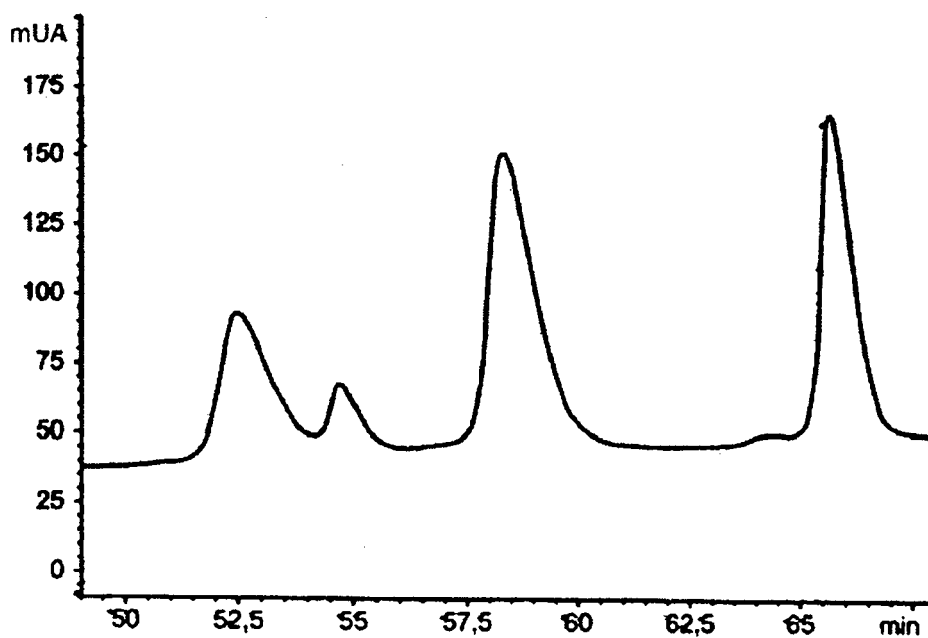


FIG. 7

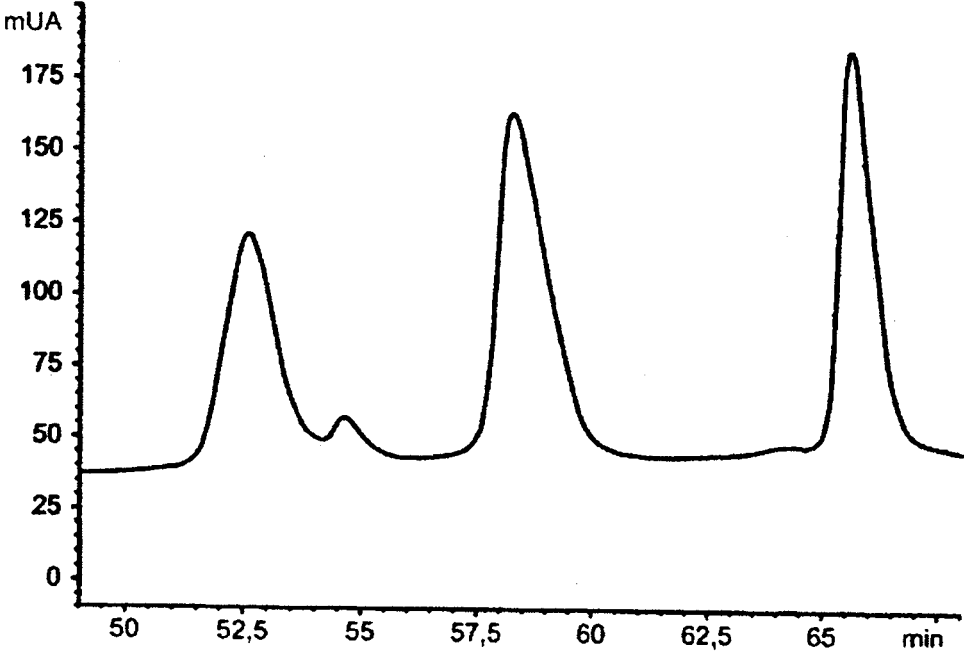


FIG. 8

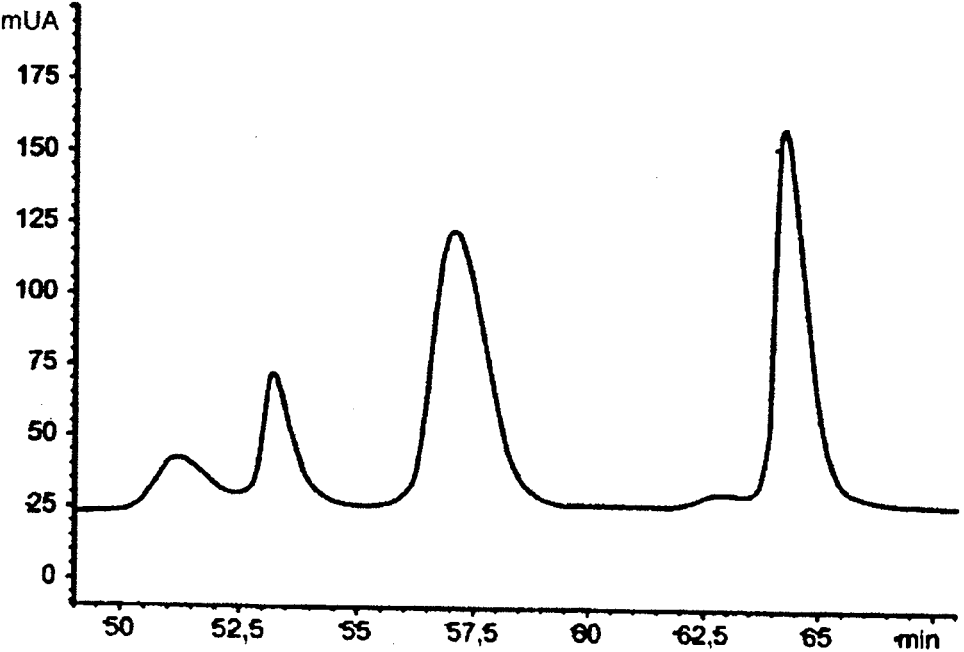


FIG. 9