



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 313 912**

(51) Int. Cl.:  
**C12N 9/68** (2006.01)  
**A61K 38/48** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **00991956 .4**  
(96) Fecha de presentación : **13.11.2000**  
(97) Número de publicación de la solicitud: **1232254**  
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **21.08.2002**

(54) Título: **Procedimiento para la producción de una composición de plasmina acidificada inactiva de manera reversible.**

(30) Prioridad: **13.11.1999 US 438331**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2009**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2009**

(73) Titular/es: **Talecris Biotherapeutics, Inc.**  
**4101 Research Commons, Suite 300**  
**79 T.W. Alexander Drive**  
**Research Triangle Parck**  
**North Carolina 27709, US**

(72) Inventor/es: **Dadd, Christopher;**  
**Stenland, Christopher, J.;**  
**Kent, Jonathan, D.;**  
**Korneyeva, Marina, N.;**  
**Baumbach, George, A.;**  
**Cook, Scott, A.;**  
**Bradley, Rita, T.;**  
**Novokhatny, Valery y**  
**Villines, Tanette, B.**

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

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de una composición de plasmina acidificada inactiva de manera reversible.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a un procedimiento para producir plasmina y más particularmente a un procedimiento para purificar y aislar la plasmina bajo condiciones que la estabilicen frente a la degradación.

10 **Antecedentes**

La fibrina es una proteína fibrosa insoluble blanca formada a partir del fibrinógeno por la acción de la trombina. En la coagulación de la sangre, la fibrina forma el andamiaje estructural de un trombo, que es un coágulo de sangre formado dentro de un vaso sanguíneo que permanece fijado a su lugar de origen. Bajo condiciones normales el sistema de coagulación de la sangre se mantiene en equilibrio y los depósitos de fibrina se disuelven por medio del sistema enzimático fibrinolítico. Desafortunadamente, los acontecimientos tales como el daño vascular, la activación/estimulación de las plaquetas y la activación de la cascada de la coagulación pueden perturbar el equilibrio y pueden dar lugar a trombosis o a la obstrucción de un vaso sanguíneo por un coágulo de sangre.

La trombosis intravascular es uno de los acontecimientos patológicos más frecuentes que explican más del 50% de todas las muertes así como una diversidad de otros problemas clínicos serios. Las obstrucciones vasculares que se desarrollan de manera más espontánea se deben a la formación de coágulos de sangre intravasculares, también conocidos como trombos. Los pequeños fragmentos de un coágulo pueden separarse del cuerpo del coágulo y viajar a través del sistema circulatorio para depositarse en órganos distantes e iniciar la formación de otro coágulo. El infarto de miocardio, el ictus oclusivo, la trombosis venosa profunda (DVT) y la enfermedad arterial periférica son consecuencias bien conocidas de los fenómenos tromboembólicos.

Los activadores del plasminógeno son actualmente los agentes favoritos usados en la terapia trombolítica, todos ellos convierten el plasminógeno en plasmina y promueven la fibrinólisis al interrumpir la matriz de fibrina (M.A. Creager y V.J. Dzau, *Vascular Diseases of the Extremities*, págs. 1398-1406 en *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14<sup>o</sup> ed., Fauci y col., editores, McGraw-Hill Co., Nueva York, 1998; cuyo contenido se incorpora en este documento por referencia en su totalidad).

Los activadores del plasminógeno más ampliamente utilizados incluyen una forma recombinante del activador de tipo tisular del plasminógeno (tPA), la urocinasa (UK) y la estreptocinasa (SK), así como una nueva generación de activadores del plasminógeno seleccionados por una mejor farmacocinética y propiedades de unión a la fibrina. Todos estos activadores del plasminógeno, sin embargo, en virtud de su mecanismo de acción, actúan indirectamente y necesitan una fuente adecuada de su sustrato común, el plasminógeno, en el sitio del trombo para llevar a cabo la lisis.

La UK y el tPA convierten el plasminógeno en plasmina directamente al escindir el enlace peptídico Arg<sup>560</sup>-Val<sup>561</sup>. Las dos cadenas polipeptídicas resultantes de plasmina se mantienen juntas por medio de dos puentes disulfuro intercadenas. La cadena liviana (LC) de 25 kDa lleva el centro catalítico y es homóloga a la tripsina y a otras serina proteasas. La cadena pesada (HC) (60 kDa) está constituida por cinco estructuras kringle de triple bucle con secuencias de aminoácidos muy similares. Algunos de estos kringles contienen los llamados sitios de unión de lisina que son responsables de la interacción del plasminógeno y la plasmina con la fibrina, la alfa 2-antiplasmina u otras proteínas. La SK y la estafilocinasa activan el plasminógeno indirectamente al formar un complejo con el plasminógeno, que posteriormente se comporta como activador del plasminógeno para activar otras moléculas de plasminógeno al escindir el enlace arginina-valina.

Aunque los fármacos trombolíticos, tales como el activador tisular del plasminógeno (tPA), la estreptocinasa y la urocinasa, se han utilizado clínicamente con éxito para reducir el grado de una obstrucción trombótica de un vaso sanguíneo, aparentemente persisten serias limitaciones con respecto a su uso en la terapia trombolítica actual. Por ejemplo, como la activación del plasminógeno por el tPA es dependiente de la fibrina para que tenga lugar la actividad proteolítica completa (*Haber y col.* 1989), su uso puede dar como resultado un sangrado excesivo. Otras secuelas adversas asociadas con el uso de estos agentes trombolíticos incluyen el infarto de miocardio, el ictus oclusivo, la trombosis venosa profunda y la enfermedad arterial periférica.

Además, los activadores del plasminógeno conocidos usados actualmente sufren de varias limitaciones que afectan su utilidad general en la eliminación de un trombo. Por ejemplo, en el mejor de los casos, el uso de la terapia trombolítica actual da como resultado la restauración del flujo sanguíneo vascular en el plazo de 90 minutos en aproximadamente el 50% de los pacientes, mientras que se produce reoclusión coronaria aguda en aproximadamente el 10% de los pacientes. La recanalización coronaria requiere en promedio 45 minutos o más, y se presenta hemorragia intracerebral en el 0,3% al 0,7% de los pacientes. La mortalidad residual es de al menos el 50% del nivel de mortalidad en ausencia del tratamiento de trombolisis.

Un enfoque diferente para evitar los problemas asociados con la administración sistémica de un activador del plasminógeno para generar suficiente plasmina en el sitio del trombo, es administrar directamente la plasmina misma al paciente.

## ES 2 313 912 T3

En la Patente de EEUU N° 5.288.489, Reich y col., describen un tratamiento fibrinolítico que incluye introducir plasmina por vía parenteral en el cuerpo de un paciente. La concentración y el tiempo del tratamiento se seleccionan para que resulten suficientes para permitir que la plasmina activa adecuada alcance una concentración suficiente en el sitio de un trombo intravascular para lisar el trombo o reducir los niveles de fibrinógeno circulante. Sin embargo, también se describe la necesidad de generar la plasmina a partir de plasminógeno inmediatamente antes de su introducción en el cuerpo.

En contraste, la Patente de EEUU N° 3.950.513 para Jenson enseña que las composiciones de plasmina pueden estabilizarse a pH 7,0 incluyendo un aminoácido fisiológicamente no tóxico. Este procedimiento diluye las disoluciones madre de plasmina almacenadas a pH bajo con el aminoácido neutralizante inmediatamente antes de la administración. Existen ventajas, sin embargo, en el hecho de mantener el pH bajo de la composición de plasmina el mayor tiempo posible para reducir al mínimo la autodegradación. Idealmente, la plasmina se mantendrá a un pH bajo hasta encontrar la fibrina diana.

*Yago y col.* describen composiciones de plasmina útiles como reactivo de diagnóstico en la Patente de EEUU N° 5.879.923. Las composiciones de *Yago y col.* comprenden plasmina y un componente adicional que pueden ser 1) un oligopéptido que comprende al menos dos aminoácidos, o 2) al menos dos aminoácidos, o 3) un solo aminoácido y un alcohol polihídrico. Sin embargo, las composiciones de *Yago y col.* se formulan a un pH neutro para mantener la actividad enzimática de la plasmina.

Castellino y Sodetz describen la preparación de plasminógeno e isoenzimas de plasmina de conejo en *Methods in Enzymology* 45: 273-286, 1976.

La plasmina como agente trombolítico potencial tiene numerosas dificultades técnicas. Estas dificultades incluyen el desafío de preparar plasmina pura que esté libre de toda traza funcional del activador del plasminógeno usado para convertir la plasmina a partir de su precursor inactivo, el plasminógeno. Las preparaciones de plasmina están típicamente muy contaminadas por el activador del plasminógeno, estreptocinasa o urocinasa y, por consiguiente, la actividad trombolítica se atribuyó a los activadores del plasminógeno contaminantes más que a la plasmina misma. Los activadores del plasminógeno contaminantes podían también provocar hemorragia sistémica en sitios diferentes al sitio diana de la trombosis. Una desventaja de las preparaciones de plasmina que contienen estreptocinasa es que la estreptocinasa puede causar reacciones inmunes adversas que incluyen fiebre y choque anafiláctico.

Uno de los factores técnicos más importantes que limitan el uso clínico de la plasmina es que la plasmina, como serían proteasa con amplia especificidad, es muy propensa a la autodegradación y pérdida de actividad. Esta circunstancia proporciona desafíos importantes para la producción de plasmina de alta calidad, para la formulación estable de esta proteasa activa durante períodos prolongados de almacenamiento antes del uso, y para la administración segura y eficaz de la plasmina a los pacientes humanos que sufren trombos oclusivos. Por consiguiente, existe la necesidad de un procedimiento para producir plasmina estable.

### Resumen

La presente invención proporciona un procedimiento para producir una plasmina acidificada inactiva de manera reversible por activación de plasminógeno y un procedimiento para producir un plasminógeno purificado. La plasmina producida se aísla y almacena en un agente con capacidad de tampón de pH bajo para proporcionar una formulación sustancialmente estable. El plasminógeno purificado se purifica típicamente a partir de una fracción obtenida en la separación de inmunoglobulinas de la Fracción II + III por cromatografía de afinidad con una elución a pH bajo. La plasmina acidificada inactiva de manera reversible puede usarse en la administración de una terapia trombolítica.

Brevemente, el procedimiento para purificar la plasmina comprende escindir un plasminógeno en presencia de un activador de plasminógeno para dar una plasmina activa y eliminar el activador del plasminógeno de la plasmina activa para formar una disolución de plasmina. A la disolución final de plasmina se le puede añadir un agente con capacidad de tampón de pH bajo para formar una plasmina acidificada inactiva de manera reversible.

El activador del plasminógeno puede eliminarse de la plasmina activa uniendo la plasmina activa a un material absorbente específico para la plasmina activa para formar una plasmina unida. Uno de tales materiales absorbentes específicos para plasmina activa puede comprender benzamidina. Una vez unida, la plasmina activa puede eluirse con una disolución de pH bajo para formar una disolución final de plasmina. El activador del plasminógeno puede también eliminarse por interacción hidrófoba.

Otro procedimiento para purificar la plasmina comprende escindir el plasminógeno para obtener una plasmina activa y unir la plasmina activa a un material absorbente específico para la plasmina activa para formar una plasmina unida. La plasmina unida puede eluirse con un aminoácido sustancialmente neutro para formar una disolución final de plasmina que esté sustancialmente libre de plasmina degradada. El aminoácido sustancialmente neutro puede comprender un omega aminoácido y se típicamente se elimina de la plasmina final por filtración. La plasmina final puede también tamponarse con un agente con capacidad de tampón de pH bajo.

El procedimiento para la purificación del plasminógeno a partir de una fuente de plasma incluye las etapas de añadir la disolución que contiene plasminógeno a un material absorbente específico para el plasminógeno y a continuación

eluir el plasminógeno del material absorbente específico para el plasminógeno a un pH de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4. Posteriormente se recoge el plasminógeno purificado como un eluato. Además, el proceso puede incluir procedimientos para la purificación de micro- o mini-plasmina(plasminógeno) u otras formas truncadas o modificadas de plasmina(plasminógeno).

Por consiguiente, ahora se proporciona un procedimiento que aborda de manera satisfactoria los problemas de los procedimientos existentes y proporciona distintas ventajas sobre tales procedimientos. Otros objetos, características y ventajas de la invención resultarán más evidentes tras revisar la descripción detallada que se presenta a continuación cuando se toma conjuntamente con las figuras de los dibujos acompañantes, que se describen brevemente de la siguiente manera.

### Breve descripción de las Figuras

En los dibujos:

La Figura 1 representa gráficamente el efecto de derivados de lisina en la recuperación de plasminógeno y la eliminación de lípidos del filtrado I de la torta de caprilato 1 (CCI) a través de precipitación con PEG/filtración en profundidad,

La Figura 2 representa gráficamente los datos nefelométricos para el extracto de CCI y posteriores filtrados I y II;

La Figura 3 representa un gel de SDS-PAGE reducido teñido con coomassie (Tris-Glicina al 10-20%) del extracto de CCI, filtrados y retenido de UF/DF;

La Figura 4 representa un SDS-PAGE reducido teñido con coomassie (Tris-Glicina al 10-20%) de la purificación de Pmg por afinidad en lisina SEPHAROSE 4B.

La Figura 5 representa gráficamente un cromatograma de lisina SEPHAROSE 4B para la purificación por afinidad de Pmg;

La Figura 6 representa un SDS-PAGE reducido teñido con coomassie (Tris-Glicina al 10-20%) del ajuste del pH del eluato de lisina SEPHAROSE 4B (Pmg) con y sin presencia de ácido épsilon amino caproico;

La Figura 7 representa gráficamente la estabilidad de la disolución de activación de estreptocinasa tras la interrupción con NaCl 0,5 M,  $\epsilon$ -ACA 0,25 M;

La Figura 8 representa gráficamente el cromatograma de benzamidina SEPHAROSE 6B para la purificación por afinidad de Pm activada con SK;

La Figura 9 representa un SDS-PAGE reducido teñido con coomassie (Tris-Glicina al 10-20%) de Pm purificado con benzamidina SEPHAROSE 6B;

La Figura 10 representa gráficamente el cromatograma de la cromatografía de interacción hidrófoba (Octil SEPHAROSE 4 FF) para la eliminación de la estreptocinasa; y

La Figura 11 representa un SDS PAGE no reducido y una transferencia Western de anti-SK.

### Descripción detallada

La presente invención comprende un procedimiento para producir una plasmina acidificada inactiva de manera reversible en combinación con un agente con capacidad de tampón de pH bajo y un procedimiento para la purificación de plasminógeno a partir de una fuente de plasma. La disolución de plasmina acidificada inactiva puede también incluir un estabilizador además de estar inactivada en la disolución tamponada. El procedimiento para purificar el plasminógeno proporciona tanto la inactivación como la eliminación de patógenos en la elución del plasminógeno a un pH bajo. La preparación de plasmina acidificada inactiva puede usarse en la administración de una terapia trombolítica.

#### *Purificación del plasminógeno*

La presente invención incluye un procedimiento para la purificación de plasminógeno y plasmina y al mismo tiempo, procedimientos para la inactivación y eliminación de contaminantes virales y de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (TSE) durante estos procedimientos. El material de partida, plasminógeno, puede purificarse de la pasta de la Fracción de Cohn II + III por cromatografía de afinidad en Lys-SEPHAROSE como describieron Deutsch y Mertz (1970). SEPHAROSE es la marca registrada de Pharmacia, Inc. de Nueva Jersey para una sustancia de alto peso molecular para la separación de macromoléculas por filtración en gel. El procedimiento puede realizarse en cualquier fuente de plasma, fuente recombinante, fuente de cultivo celular o fuente transgénica. Por ejemplo, puede usarse plasma de una fracción de desecho derivada de la purificación de inmunoglobulinas a partir de un procedimiento cromatográfico como está descrito en la Solicitud de Patente de EEUU N° de Serie 09/448.771, del solicitante, presentada el 24 de noviembre de 1999, que se incorpora por referencia en este documento.

## ES 2 313 912 T3

El plasminógeno se extrajo de esta fracción de desecho (denominada en este documento “torta de caprilato 1” (CCI)) en un amplio intervalo de pH. Las condiciones de extracción pueden variarse desde un pH de aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 10,5 usando una diversidad de tampones capaces de proporcionar un pH en este intervalo, incluidos tampones de citrato, acetato, tris, imidazol, histidina, HEPES y/o de fosfato. La extracción puede tener lugar a temperaturas desde aproximadamente 4°C hasta 37°C y puede llevarse a cabo durante 1 a 24 horas sin efectos perjudiciales. Además, puede variarse la fuerza iónica por medio de la adición de cloruro de sodio aproximadamente 0,2 M sin efecto perjudiciales sobre la extracción del plasminógeno.

Tras la extracción del plasminógeno, se redujo la cantidad de impurezas de lípidos y proteínas y TSE por precipitación con la adición de polietilenglicol (PEG), en un intervalo de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10% peso/volumen o la adición de sulfato de amonio a una concentración de aproximadamente 80 hasta aproximadamente 120 g/l. El precipitado de PEG o sulfato de amonio se eliminó por filtración en profundidad y la disolución resultante se colocó en una columna de resina de afinidad con lisina.

Si se desea, puede aumentarse la solubilidad del plasminógeno por medio de la adición de omega aminoácidos (lisina, arginina, ácido tranexámico o ácido épsilon amino caproico, o sus combinaciones o análogos) tras la extracción de la torta de caprilato I. El aumento de solubilidad puede llevarse a cabo con omega aminoácido desde aproximadamente 0,02 M hasta aproximadamente 1 M, de preferencia parece ser suficiente lisina aproximadamente 0,1 M. Si se añade, la lisina se elimina de preferencia después de la precipitación con PEG o sulfato de amonio y la filtración en profundidad por diafiltración y la disolución resultante se coloca en una columna de resina de afinidad de lisina. La frase “resina de afinidad de lisina” se usa generalmente para resinas de afinidad que contienen lisina o sus derivados o ácidos épsilon amino caproicos como el ligando. La columna puede eluirse con una disolución de pH bajo de aproximadamente 1 a 4.

La proteína obtenida tras la elución de la columna de afinidad es por lo general al menos un 80% plasminógeno. El plasminógeno purificado se almacena a continuación a pH bajo en presencia de tampones simples tales como glicina y lisina u omega aminoácidos. El almacenamiento a pH bajo proporciona también una oportunidad para la inactivación y la eliminación viral y la eliminación de TSE según se determina por procedimientos de detección de contaminantes. Los estudios de los inventores sugieren que la plasmina cumple con los requerimientos más rigurosos para el aclaramiento 6 log de virus no encapsulados incluidas una etapa de eliminación 4 log y el aclaramiento 10 log para virus encapsulados incluidas dos etapas de eliminación 4 log independientes. Además de el aclaramiento viral suficiente, la plasmina tiene más de 6 logs de eliminación de infectividad de TSE para mayor seguridad.

A continuación se activó el plasminógeno en disolución a plasmina por medio de la adición de un activador de plasminógeno, que puede alcanzarse en una serie de formas incluidas pero no limitadas a estreptocinasa, urocinasa, o el uso de urocinasa inmovilizada en resina y el uso de estreptocinasa inutilizada en resina. El activador de plasminógeno de preferencia es la estreptocinasa soluble. Se mostró que la adición de estabilizadores tales como glicerol, y omega aminoácidos tales como lisina, poli lisina, arginina ácido épsilon amino caproico y ácido tranexámico mejora el rendimiento de la plasmina.

### *Purificación de la plasmina*

La plasmina se purificó del plasminógeno inactivado por cromatografía de afinidad en resina con benzamidina como el ligando y elución con una disolución de omega aminoácido neutro o una disolución de pH bajo. Esta etapa puede eliminar esencialmente toda la plasmina degradada así como la mayor parte de la estreptocinasa.

Como una etapa de refinamiento para la eliminación de la estreptocinasa restante, se realiza cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) a pH bajo. Tras la etapa de HIC, la plasmina se formula como una disolución proteica estéril por ultrafiltración y diafiltración y filtración de 0,22 µm.

El presente procedimiento incluye además las etapas de activar el plasminógeno a plasmina usando un activador de plasminógeno y a continuación capturar la plasmina activa formada en un material absorbente específico para la plasmina activa. A continuación se eluye la plasmina unida con un tampón de pH bajo. La plasmina eluida se tampona con un agente con capacidad de tampón de pH bajo tal como un ácido. Típicamente, la plasmina eluida se tampona hasta un pH de entre aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 4.

La baja capacidad tamponadora del tampón ácido ayuda a permitir que la plasmina acidificada inactivada de manera irreversible pueda volver rápidamente al pH fisiológico y a continuación activarse cuando se administra como un agente trombolítico. Típicamente, el tampón se añade en una concentración en la que el pH de la plasmina acidificada se eleva hasta pH neutro por la adición de no más de aproximadamente 5 veces el volumen de suero a la plasmina acidificada.

### *Escisión del plasminógeno para dar una plasmina activa*

El plasminógeno puede escindirse a plasmina usando una concentración catalítica de un activador de plasminógeno soluble o inmovilizado. La plasmina, la principal enzima fibrinolítica en los mamíferos, es una serina proteasa con especificidad análoga a la tripsina que deriva del precursor zimógeno inactivo plasminógeno circulante en el plasma. El plasminógeno mismo es un polipéptido de 790 aminoácidos que tiene un residuo glutamato en el extremo N

terminal. Los activadores del plasminógeno tales como la estreptocinasa, el activador tisular del plasminógeno (tPA) o la urocinasa solubles escindirán la molécula de cadena única del plasminógeno para producir plasmina activa en el enlace peptídico Arg560-Val561. Las dos cadenas polipeptídicas resultantes de plasmina se mantienen juntas por dos puentes disulfuro intercadenas. La cadena liviana de 25 kDa lleva el centro catalítico y es homóloga a la tripsina y a otras serina proteasas. La cadena pesada (60 kDa) está constituida por cinco estructuras kringle de triple bucle con secuencias de aminoácidos muy similares. Algunos de estos kringles contienen los llamados sitios de unión de lisina que son responsables de la interacción del plasminógeno y la plasmina con la fibrina, la alfa 2-antiplasmina u otras proteínas.

La activación del plasminógeno puede tener lugar a aproximadamente 4°C hasta aproximadamente 37°C y típicamente toma entre aproximadamente 2 hasta 24 horas. El plasminógeno puede escindirse en presencia de estabilizadores tales como omega aminoácidos y glicerol. Los omega aminoácidos incluyen la lisina, el ácido épsilon amino caproico, el ácido tranexámico, la poli lisina, la arginina y sus combinaciones y análogos. Tras completarse la activación, la disolución de plasmina puede filtrarse y estabilizarse además durante varios días a pH neutro por medio de la adición de omega aminoácidos y cloruro de sodio y aplicarse a benzamidina SEPHAROSE.

#### *Eliminación del activador de plasminógeno e impurezas*

La plasmina activa formada a partir de la escisión del plasminógeno puede unirse a continuación a un absorbente específico para la plasmina activa para eliminar sustancialmente el activador del plasminógeno. Como la proteína de interés es una serina proteasa activa con especificidad análoga a la tripsina, puede usarse benzamidina como un absorbente específico para la plasmina activa que permite la captura de la plasmina activa. Pueden usarse otros absorbentes específicos para la plasmina activa con propiedades similares a la benzamidina. La benzamidina puede inmovilizarse en un medio de soporte sólido. El medio de soporte sólido puede ser una resina o SEPHAROSE. Además, puede usarse interacción hidrófoba para eliminar más el activador del plasminógeno.

Más específicamente, el plasminógeno escindido está contenido típicamente en una disolución de aminoácidos, cloruro de sodio y glicerol, que permite la estabilidad de la disolución durante varios días a pH neutro antes de aplicarla a una columna de benzamidina-SEPHAROSE equilibrada con aproximadamente Tris 0,05 M, pH 8,5, NaCl 0,5 M. La columna se utiliza típicamente a 4°C. La porción delantera del pico no unido contiene impurezas de alto peso molecular, siendo el resto del pico no unido representado por plasminógeno residual no activado y por productos de autodegradación de plasmina inactivos.

La plasmina unida puede a continuación eluirse con un tampón ácido o con un omega aminoácido sustancialmente neutro. La plasmina unida a benzamidina-SEPHAROSE puede eluirse con un tampón ácido tal como tampón de glicina. Cuando se usa un omega aminoácido de pH sustancialmente neutro para eluir la plasmina unida, la disolución final de plasmina eluida puede estar sustancialmente libre de plasmina degradada. Típicamente, el aminoácido de pH sustancialmente neutro tiene un valor de pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8,5. Los ejemplos de omega aminoácidos neutros incluyen la lisina, el ácido épsilon amino caproico, el ácido tranexámico, la poli lisina, la arginina y sus análogos o combinaciones.

#### *Tamponado de la disolución de plasmina con un agente con capacidad de tampón de pH bajo*

La plasmina eluida puede tamponarse con un agente con capacidad de tampón de pH bajo. El agente con capacidad de tampón de pH bajo típicamente comprende un tampón de un aminoácido, un derivado de al menos un aminoácido, un oligopéptido que incluye al menos un aminoácido, o una combinación de los anteriores. Además, el agente con capacidad de tampón de pH bajo puede comprender un tampón seleccionado de ácido acético, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido carboxílico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido benzoico, serina, treonina, metionina, glutamina, alanina, glicina, isoleucina, valina, alanina, ácido aspártico, sus derivados o combinaciones. El tampón puede estar presente en la plasmina acidificada inactiva de manera reversible a una concentración en la que el pH de la plasmina acidificada se eleva hasta pH neutro añadiendo no más de aproximadamente 4 a 5 veces el volumen de suero a la composición.

La concentración de plasmina en la disolución tamponada puede variar desde aproximadamente 0,01 mg/ml hasta aproximadamente 50 mg/ml de la disolución total. La concentración del tampón puede variar desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 50 mM. Por supuesto, estos intervalos pueden ampliarse o estrecharse según el tampón elegido, o tras la adición de otros ingredientes tales como aditivos o agentes estabilizantes. La cantidad de tampón añadida es típicamente la que llevará la disolución de plasmina acidificada inactiva de manera reversible hasta un pH de entre aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 4.

#### *Otra estabilización de la disolución de plasmina acidificada inactiva*

La disolución de plasmina acidificada inactiva de manera reversible puede estabilizarse además por medio de la adición de un agente estabilizante tal como un alcohol polihídrico, carbohidratos farmacéuticamente aceptables, sales, glucosamina, tiamina, niacinamida, o sus combinaciones. Las sales estabilizantes pueden seleccionarse del grupo constituido por cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio y sus combinaciones. También pueden añadirse azúcares o alcoholes de azúcares tales como glucosa, maltosa, manitol, sorbitol, sacarosa, lactosa, trehalosa y sus combinaciones.

Las concentraciones de carbohidratos añadidos para estabilizar la disolución de plasmina acidificada inactiva de manera reversible incluyen un intervalo desde aproximadamente 0,2% p/v hasta aproximadamente 20% p/v. Los intervalos para una sal, glucosamina, tiamina, niacinamida y sus combinaciones pueden variar desde aproximadamente 0,01 M hasta aproximadamente 1 M.

Se ha encontrado que la plasmina formulada en un agua acidificada tamponada es extremadamente estable. Puede mantenerse en esta forma durante meses sin pérdida de actividad o aparición de productos de degradación de naturaleza proteolítica o ácida. A 4°C, la plasmina es estable durante al menos nueve meses. Incluso a temperatura ambiente, la plasmina es estable durante al menos dos meses. La estabilidad a largo plazo a temperatura ambiente es importante porque hará que esta formulación sea compatible con regímenes prolongados de administración de trombolíticos. Por ejemplo, es común la administración durante 36 horas de trombolíticos tales como el activador tisular de plasminógeno o la urocinasa en el tratamiento de oclusiones arteriales periféricas.

La capacidad de una plasmina acidificada tamponada de convertirse en totalmente activa tras transferirla al pH fisiológico queda evidenciada por su actividad en el ensayo caseinolítico y también en los ensayos de lisis del coágulo de fibrina marcada con I<sup>125</sup>. Estos dos ensayos se realizan a pH 7,4 y se presentó recuperación completa de actividad de la plasmina durante el cambio de pH y al pasar a través del punto iso-pl (pH 5-5,5). Esto se debe a que la plasmina está formulada en un disolvente no tamponado y cuando se añade a una disolución tamponada (PBS o plasma) adopta el pH neutro instantáneamente y la precipitación que usualmente acompaña el lento pasaje a través del punto iso-pl no se produce.

Una característica de la plasmina activa según se usa en la presente invención es el mantenimiento de la plasmina en un tampón ácido y su formulación en agua acidificada, proporcionando una plasmina activa pura y estable. Su eficacia se demostró en ensayos *in vitro* y en un modelo unificado de trombolisis en vena yugular de conejo *in vivo*, con la enzima sustancialmente purificada o parcialmente purificada tal como, pero no limitado a, plasmina o cualquier composición que contenga plasmina que esté dentro del alcance de la presente invención.

Los siguientes ejemplos se presentan sólo para ilustrar el presente procedimiento y no se presentan para limitar la invención. Un experto en la técnica apreciará que los ejemplos presentados sólo ilustran lo que está reivindicado y que el presente procedimiento está sólo limitado en su alcance por las reivindicaciones.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Extracción de la torta de caprilato I (CCI) y reducción de lípidos por precipitación con PEG y filtración*

La torta de caprilato I (CCI) es una fracción resultante de una precipitación con caprilato a pH 5 de la Fracción II + III resuspendida en el procedimiento IGIV-C. Se extrae el plasminógeno (Pmg) de la CCI solubilizando en una proporción de torta:tampón de aproximadamente 1:10 durante 2 a 3 horas a 4°C sin mezclar. Mientras que se investigaron varias disoluciones de extracción, el procedimiento actual se realizó con Tris 100 mM, pH 10,5 para mantener el pH neutro o superior; una condición favorable para la solubilización del Pmg del CCI. La Tabla 1 representa las disoluciones de extracción investigadas junto con su pH del extracto final y la potencia del Pmg.

TABLA 1

Disoluciones de extracción de CCI y sus pH de los extractos finales resultantes y actividades del Pmg.		
Disolución de Extracción	pH del extracto final	(UI/ml)
Tris 0,1 M pH 10,5	9,2 - 9,5	1,77
Tris 0,2 M pH 7,5	7,5	2,06
Citrato 0,05 M, ε-ACA 0,2 M, NaCl 0,4 M pH 6,5	6,0	1,49
Citrato 0,15 M pH 8,3	6,7	1,21
Ácido acético al 0,4% pH 3,5	3,5	0,05

## ES 2 313 912 T3

Tras 2 a 3 horas de extracción, la temperatura del extracto se ajusta a 20°C y el pH a 7,5. La Tabla 2 muestra el rendimiento de Pmg, basado en nefelometría, a partir de Combinación de Plasmas Clarificados a través de la Fracción II+III y el Extracto de CCI.

TABLA 2

Rendimientos de etapa y de procedimiento para Pmg a partir de combinación de plasmas clarificados hasta el extracto de CCI.			
Fracción de Cohn	mg Pmg/g (DE), n	Rendimiento de etapa de Pmg %	Rendimiento de Procedimiento de Pmg %
Combinación de plasmas clarificados	0,124 (0,013), 33		
Fracción II+III	0,143 (0,024), 30	65,6	
Extracto de CCI (post L-lisina)	0,145 (0,01), 7	101	66,3

Sólo aproximadamente el 66% del Pmg en el plasma pasa a la Fracción II+III mientras que virtualmente todo el Pmg que se encuentra en la Fracción II+III resuspendida precipita y se extrae de la CCI. La extracción de CCI en Tris a pH 10,5, el pH del extracto final de CCI de 9,2-9,5, solubiliza todo el Pmg que se encuentra en la CCI.

La adición de derivados de lisina (L-lisina 100 mM, ácido épsilon amino caproico (EACA) 50 mM) aumenta la solubilidad del Pmg en el Extracto de CCI dando como resultado mayor recuperación durante las etapas posteriores de precipitación con PEG y filtración como se ilustra en la Figura 1.

La reducción de lípidos se alcanza a través de precipitación por la adición de PEG 3350 hasta 3%-4% p/p. Como se mencionó anteriormente, es necesaria la adición de L-lisina hasta 100 mM previo a la adición de PEG para mantener elevada recuperación de Pmg en el filtrado de PEG, o aproximadamente el 90%. Sin añadir lisina, se recupera sólo aproximadamente el 25% del Pmg en el filtrado de PEG (Figura 1). La precipitación con PEG tiene lugar durante 1 a 2 horas a 20°C con mezclado. Se añade una ayuda de filtro al 4% p/p y se mezcla previo a la filtración en profundidad a través de un sistema de filtración CUNO 30SP seguida por otra clarificación con filtros de 0,5 micrometros y 0,22 micrometros.

La Figura 1 muestra el contenido de lípidos, determinado por la concentración de colesterol y triglicéridos, que se reduce en 60-70% tras la precipitación con PEG y la filtración (Filtrado I de CCI). El Filtrado I de CCI se diluye 1 :1 con disolución salina tamponada con fosfato, pH 7,5 y se mantiene a 20°C durante 1 a 2 horas ya que con frecuencia continúa la precipitación tras la filtración. El Filtrado I de CCI se filtra a través de filtros de 0,5  $\mu$ m y 0,22  $\mu$ m para eliminar cualquier precipitado adicional ; Filtrado II de CCI. Los datos nefelométricos para el Extracto de CCI y los Filtrados I y II de CCI se ilustran en la Figura 2. Nótese que las concentraciones de fibrinógeno y apolipoproteína A-1 están reducidas tras la precipitación con PEG.

El Filtrado II de CCI se diafiltra por filtración de flujo tangencial (TFF) frente a disolución salina tamponada con fosfato de pH 7,5 para reducir la concentración de L-lisina para que no actúe como inhibidor competitivo para la unión de Pmg a la resina de afinidad de lisina. Los experimentos se realizaron para ilustrar la necesidad de la eliminación de la lisina. Cargar el Filtrado II de CCI directamente en una resina de afinidad de lisina sin reducir la concentración de lisina soluble, da como resultado la captura y liberación de aproximadamente 4% de actividad de Pmg. Diluir el Filtrado II de CCI 1 :1 con TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) aún dio como resultado la captura y liberación de sólo aproximadamente 5% de la actividad de Pmg. Tras 5 volúmenes de diafiltración para reducir la concentración de lisina, se capturó y liberó aproximadamente el 22% de la actividad de Pmg de la resina de afinidad de lisina (retrospectivamente, la columna estaba sobrecargada en aproximadamente 50%).

La diafiltración de volumen constante se realizó por filtración de flujo tangencial (TFF) contra 5 volúmenes de disolución salina tamponada con fosfato, pH 7,5 usando una membrana de corte de peso molecular 30 kDa. Tras la diafiltración, se concentró la disolución proteica por ultrafiltración hasta 4 a 5 A<sub>280</sub>/ml. Las recuperaciones de Pmg en



el retenido de UF/DF, por nefelometría, promediaron el 84% ( $\pm 1$ ,  $n = 3$ ). La Figura 3 muestra SDS PAGE reducido para cada intermedio del procedimiento discutido hasta aquí. Los datos en las Figuras 2 y 3 ilustran la complejidad y heterogeneidad del Extracto de CCI y los posteriores Filtrados.

## 5 Ejemplo 2

### *Purificación de Pmg por cromatografía de afinidad de lisina*

El objetivo de la cromatografía de afinidad de lisina es purificar el Pmg, que representa aproximadamente el 3 al 10 5% de la proteína total en el Filtrado II de CCI diafiltrado. El DF del Filtrado II de CCI se aplicó a la columna de resina Lisina-SEPHAROSE 4B (Amersham Pharmacia N° 17-0690-01) equilibrada con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,01 M, NaCl 0,15 M, a 3,5-4,0  $\text{A}_{280}/\text{ml}$ . Las proteínas no unidas se lavaron a través de la columna con el tampón de equilibrado y a continuación se lavó la resina con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,01 M, NaCl 0,5 M, pH 7,5 para eliminar la proteína unida inespecíficamente; no se eliminaron proteínas. La proteína unida, Pmg, se eluyó con glicina 0,1 M, lisina 0,03 M pH 3,0 y se recogió con 15 mezclado para mantener el pH bajo. Las Figuras 4 y 5 muestran el análisis en SDS PAGE y el cromatograma de la purificación por afinidad de lisina del Pmg, respectivamente. La resina se limpió consecutivamente con NaOH 0,1 N y NaCl 2,0 M, Triton X-100 al 0,1% y se almacenó en etanol al 20%. La Tabla 3 muestra el rendimiento de etapa de Pmg por nefelometría y la pureza por SDS PAGE reducido.

20

TABLA 3

25

Rendimiento y pureza de etapa de Pmg para la cromatografía de afinidad con lisina		
Intermedio del procedimiento	% de Rendimiento de etapa	% de Pureza de Pmg
Eluato de lisina- SEPHAROSE 4B	75,7	85,9

30

35

## Ejemplo 3

### *Inactivación y eliminación viral y eliminación de TSE*

40

#### *Nanofiltración*

45

50

Se probó la colocación óptima de una etapa de nanofiltración durante el procedimiento de la plasmína, junto con la determinación de las condiciones óptimas para la eliminación de patógenos del eluato de afinidad de lisina del Pmg (Pmg) para un esquema particular de nanofiltración. Se contaminó el Pmg con PPV o BVDV y se filtró a través de una membrana de filtro PALL DV20. Todos los procedimientos se realizaron con 50 ml de material de partida (Pmg 0,3 mg/ml), presión constante de 30 psi (2 bar), pH 3,4 a temperatura ambiente. La disolución desafío se prefiltro a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  previo a la nanofiltración. Los factores determinantes para las condiciones óptimas para la eliminación de diferentes patógenos por nanofiltración están relacionados principalmente con la obtención de un mínimo de 4 log de eliminación de infectividad de patógenos conocidos, el porcentaje de recuperación del producto, el porcentaje de potencia remanente, la concentración del producto y el pH del producto. Se detectó que el aclaramiento de PPV y BVDV fue  $> 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub> (dosis infectiva de cultivo tisular 50%). La etapa de nanofiltración tiene también la capacidad de eliminar más de 4 log de TSE. Todas las recuperaciones de productos obtenidas en el estudio fueron  $\geq 95\%$  sin cambios sustanciales en la actividad del Pmg.

55

#### *Inactivación viral con caprilato*

60

65

Como la inactivación con caprilato es mucho más dependiente del pH y más eficaz bajo condiciones de pH ácido, resultó lógico estudiar la inactivación de virus por caprilato en la etapa de elución de la cromatografía de afinidad de lisina de pH bajo. Se usó BVDV como un virus encapsulado modelo para estudiar la actividad viricida del caprilato en el eluato de afinidad de lisina. Se detectó inactivación completa de BVDV, dando como resultado una reducción  $\geq 4,4 \log_{10}$ , en el eluato de la columna de afinidad de lisina con caprilato 3 mM a pH 3,4 durante 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en presencia de una concentración de Pmg de 1,5 mg/ml. En ausencia del producto, también se alcanzó la detectó inactivación completa de BVDV (reducción  $\geq 4,7 \log_{10}$ ) con caprilato 3 mM tras 30 minutos a pH 3,4. No se observó precipitación visible durante el tratamiento con caprilato sugiriendo que el producto y el contaminante viral permanecen solubles y no precipitan por el caprilato. El impacto del caprilato añadido sobre la recuperación o potencia del producto tras la cromatografía en columna de afinidad de lisina fue mínimo.

*Precipitación con PEG*

Se investigó el efecto del PEG en la eliminación de TSE. La clarificación y eliminación de lípidos alcanzada por la filtración en profundidad y la precipitación con PEG al 3% del Extracto de la Torta de Caprilato I dio como resultado una eliminación de TSE mayor que 2 log<sub>10</sub>.

TABLA 4

Aclaramiento total de virus/TSE a lo largo del procedimiento de plasmina			
Etapas	BVDV	PPV	TSE
Nanofiltración	> 4 log	4 log	4 log
Caprilato 3 mM	> 4 log	< 1 log	< 1 log
Afinidad con lisina	3,3 log	2,5 log	pendiente
Precipitación con PEG	< 1	< 1	2-3 logs
Aclaramiento total	> 12	> 6	> 6

## Ejemplo 4

*Activación de Pmg a Pm (Pm) con estreptocinasa (SK):*

La adición de SK a la disolución purificada de Pmg provoca la conversión de Pmg en Pm. El eluato de la columna de afinidad de lisina de pH 3,4 se concentra por TFF hasta 2 mg/ml a través de una membrana de corte de peso molecular de 30 kD. La temperatura de la disolución de Pmg se hace bajar hasta 4°C y se añade un estabilizante de Pmg, EACA, hasta una concentración final de 20 mM para proteger el Pmg frente a daños durante el ajuste de pH desde 3,4 hasta 7,5. Sin la adición de EACA, aparece una especie de 67 kDa tras el cambio de pH. La presencia de EACA durante el ajuste del pH da como resultado una degradación disminuida del Pmg comparada con el ajuste del pH sin EACA (Figura 6). Una vez ajustado el pH hasta 7,5, se diluye la disolución de Pmg 1:1 con glicerol al 20%, a 4°C, hasta alcanzar una condición final de 1 mg de Pmg/ml, glicina 0,05 M, L-lisina 0,015 M, EACA 0,01 M, glicerol al 10% y pH 7,5. Estas condiciones se han optimizado para reducir al mínimo la autodegradación de Pm. Se añade SK a esta disolución en una proporción molar de Pmg:SK de 100:1. La mezcla de reacción de SK se mezcla a 4°C durante 16 horas para permitir la activación de Pmg a Pm. El promedio de pureza relativa por ciento, según se determina por SDS PAGE reducido, de cada uno de los 4 grupos de especies proteicas (Pmg, Pm HC, Pm LC e impurezas/Pm fraccionada) de 14 reacciones de activación de SK se presentan en la Tabla 5.

TABLA 5

Porcentaje promedio relativo de Pmg, Pm (HC, LC) e impurezas/Pm fraccionada por SDS PAGE reducido tras la activación con SK; n = 14.		
Proteína	% de Pureza promedio	DE
Pmg	20,3	5,3
Pm	68,5	4,4
Cadena pesada de Pm	49,0	2,9
Cadena liviana de Pm	19,4	1,5
Impurezas/Pm fraccionada	11,3	1,8

## ES 2 313 912 T3

Los datos muestran que la activación con SK es reproducible y da como resultado sólo aproximadamente 11% de Pm fraccionada/impurezas mientras que la activación de Pmg a Pm es de aproximadamente 80%. Para detener la activación y las reacciones de autodegradación de Pm, se añade NaCl y EACA hasta concentraciones finales de 0,5 M y 0,25 M, respectivamente. Esta disolución es estable con respecto a la integridad de la Pm, durante al menos 4 días a 4°C. La Figura 7 ilustra que no hay cambios en la pureza de la Pm o autodegradación de la Pm (Otro) durante este período de tiempo.

### Ejemplo 5

#### *Purificación de Pm por cromatografía de afinidad con benzamidina*

El objetivo de la purificación de afinidad con benzamidina es la separación del Pmg inactivado y las impurezas, incluidos los productos de degradación de Pm, de la Pm activa. Se aplica la disolución de activación con SK estable, con pH ajustado hasta 8,5 en glicina 0,05 M, L-lisina 0,015 M, EACA 0,25 M, NaCl 0,5 M, glicerol al 10% a una columna de Benzamidina-SEPHAROSE 6B (Amersham Pharmacia N° 17-0568-01) equilibrada con Tris 50 mM Tris, NaCl 500 mM, pH 8,5. La Pm, fragmentada e intacta, es capturada por la resina de afinidad mientras que las impurezas antes mencionadas fluyen a través de la columna. La columna se lava con el tampón de equilibrado hasta que la absorbancia a 280 nm alcanzan la línea basal. A continuación se eluye la Pm unida en cualquiera de estas dos maneras: 1) eliminar la resina y eluir en el formato por lotes con glicina 0,1 M, lisina 0,03 M, pH 3,4; 2) eluir en un formato en columna con EACA 1 M, pH 7,5. La elución con EACA a pH 7,5 elimina sólo la Pm intacta mientras que la Pm dañada permanece unida a la resina. Una etapa para retirar todas las proteínas restantes. La Figura 8 muestra un perfil de elución de EACA típico, en formato de columna. El perfil de elución por lotes está constituido sólo por el pico de proteína no unida ya que la resina se elimina a continuación de la columna para la elución de Pm. La Pm capturada y eluida de la resina de afinidad está un 87-91% intacta (no autodegradada) como se ilustra en la Figura 9 y  $\geq 99\%$  de Pm total. La elución de Pm de la resina de benzamidina con EACA resultó inesperada ya que los derivados de lisina tales como EACA interactúan con la cadena pesada de Pm mientras que la benzamidina interactúa con la cadena liviana.

### Ejemplo 6

#### *Eliminación del activador de Pmg SK*

El objetivo de estas etapas es eliminar el activador de Pmg SK de manera que la única actividad de disolución del coágulo de fibrina restante sea la de la Pm. La etapa de afinidad con benzamidina elimina  $>99\%$  de la SK de la Pm como se ilustra en la Tabla 6.

TABLA 6

Eliminación de SK, según se determina por medio de ELISA, por cromatografía de afinidad con benzamidina y por cromatografía de interacción hidrófoba	
Etapas del procedimiento de plasmina	Estreptocinasa (ng/ml)
Activación con SK	1930,1
Benzamidina-SEPHAROSE no unida	1549,5
Pm eluida de benzamidina-SEPHAROSE	1,9
HIC Pm no unida	0,7
HIC vaciado con NaOH (SK)	1,3
Pm de formulación final	<0,5

La etapa de interacción hidrófoba usando Octil SEPHAROSE 4 FF (Amersham Pharmacia N° 17-0946-02) actúa como una etapa de refinamiento para eliminar esencialmente cualquier SK restante. El producto final estéril de Pm no tiene SK detectable por ELISA. El eluato de EACA 1M, pH 7,5 de la columna de afinidad de benzamidina, se ajusta hasta pH 3,4 y se añade  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta una concentración final de 0,1 M. Esto actúa como la carga de proteína para la columna Octil SEPHAROSE 4 FF. La columna se equilibra con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 M, glicina 0,1 M, lisina 30 mM, pH 3,4. La Pm fluye a través de la columna mientras que la SK se une a la columna y se separa de la Pm. La SK capturada

## ES 2 313 912 T3

se elimina de la resina junto con NaOH 0,1 hasta 1,0 N. La Figura 9 es un cromatograma de Octil-SEPHAROSE 4 FF de una prueba del principio del experimento. Pmg y SK se mezclaron en una proporción molar de Pmg:SK de 2:1 y se sometió a cromatografía en Octil SEPHAROSE 4 FF. Los elevados niveles de SK se usaron para poder hacer un seguimiento a lo largo del ciclo cromatográfico usando una transferencia Western de anti-SK. La Figura 10 ilustra la eliminación de SK de la Pm por SDS PAGE y transferencia Western de anti-SK. El patrón de SK (paneles A y B; carril 1) migra a su peso molecular real de 47 kDa. Una vez mezclada con Pmg, la SK se modifica y migra más rápido y como varias especies. No hay SK detectable en la fracción de proteínas no unidas, que contiene la carga de la Pm, por transferencia Western de anti-SK (panel B, carril 3).

Los resultados para preparaciones finales estériles de Pm purificada por cromatografías de afinidad con benzamida y HIC, según se describieron anteriormente, se presenta en la Tabla 7.

TABLA 7

% Promedio relativo de pureza de Pm (HC, LC) por SDS PAGE reducido tras HIC; n = 2.	
Proteína	% de Pureza promedio
Pmg	0,0
Pm	95,5
Cadena pesada de Pm	66,5
Cadena liviana de Pm	29,0
Impurezas/Pm fraccionada	4,5

Mientras que se han presentado formas de realización específicas como se ha ilustrado y descrito anteriormente, se reconoce que pueden realizarse variaciones con respecto a las formas de realización descritas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para purificar plasmina que comprende:

escindir un plasminógeno en presencia de un activador de plasminógeno para dar una plasmina activa;

eliminar sustancialmente el activador de plasminógeno de la plasmina activa para formar una disolución de plasmina; y

tamponar la disolución de plasmina con un agente con capacidad de tampón de pH bajo para formar una plasmina acidificada inactiva de manera reversible,

en el que el agente con capacidad de tampón de pH bajo está presente en una concentración en la que el pH de la plasmina acidificada se eleva hasta pH neutro añadiendo no más de 5 veces el volumen de suero a la plasmina acidificada.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de eliminar sustancialmente el activador de plasminógeno incluye las etapas de:

unir la plasmina activa a un material absorbente específico para plasmina activa para formar una plasmina unida; y

eluir la plasmina unida con una disolución de pH bajo para formar la disolución de plasmina.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el material absorbente específico para plasmina activa comprende benzamidina.

4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el activador del plasminógeno se elimina además por interacción hidrófoba.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, que además incluye la escisión del plasminógeno en presencia de estabilizadores que comprenden omega aminoácidos y glicerol.

6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el plasminógeno se escinde usando una concentración catalítica de un activador de plasminógeno seleccionado del grupo constituido por activadores del plasminógeno inmovilizados, solubles y sus combinaciones.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el activador del plasminógeno se selecciona del grupo constituido por estreptocinasa, urocinasa, tPA y sus combinaciones.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el activador del plasminógeno es estreptocinasa soluble.

9. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el activador del plasminógeno se inmoviliza en un medio de soporte sólido que comprende SEPHAROSE.

10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente con capacidad de tampón de pH bajo comprende un tampón que comprende un aminoácido, un derivado de al menos un aminoácido, un oligopéptido que incluye al menos un aminoácido o una combinación de los mismos.

11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente con capacidad de tampón de pH bajo comprende un tampón seleccionado de ácido acético, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido carboxílico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido benzoico, serina, treonina, metionina, glutamina, alanina, glicina, isoleucina, valina, alanina, ácido aspártico, sus derivados o combinaciones.

12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la disolución de plasmina acidificada inactiva de manera reversible tiene un pH de entre 2,5 y aproximadamente 4.

13. El procedimiento de la reivindicación 1, que además incluye estabilizar la plasmina acidificada inactiva de manera reversible añadiendo un agente estabilizante seleccionado de un alcohol polihídrico, carbohidratos farmacéuticamente aceptables, sales, glucosamina, tiamina, niacinamida, o sus combinaciones.

14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que las sales se seleccionan del grupo constituido por cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio y sus combinaciones.

15. El procedimiento de la reivindicación 1, que además incluye estabilizar la plasmina acidificada inactiva de manera reversible añadiendo un azúcar o alcohol de azúcar seleccionado de glucosa, maltosa, manitol, sorbitol, sacarosa, lactosa, trehalosa o sus combinaciones.

## ES 2 313 912 T3

16. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la elución de la plasmina unida se logra eluyendo la plasmina unida con un aminoácido a un pH de 6,5 hasta 8,5 para formar una disolución de plasmina final que esté sustancialmente libre de plasmina degradada.

5 17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el plasminógeno se escinde usando una concentración catalítica de un activador de plasminógeno.

10 18. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que la disolución de plasmina activada se estabiliza por medio de la adición de omega aminoácidos y cloruro de sodio.

19. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que dicho aminoácido comprende un omega aminoácido.

15 20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que el omega aminoácido se selecciona del grupo constituido por lisina, ácido épsilon amino caproico, ácido tranexámico, poli lisina, arginina, sus análogos y sus combinaciones.

21. El procedimiento de la reivindicación 16, que además incluye eliminar por filtración dicho aminoácido de la disolución de plasmina final.

20 22. El procedimiento de la reivindicación 16, que además incluye añadir un agente con capacidad de tampón de pH bajo a la disolución de plasmina final para formar una plasmina acidificada inactiva de manera reversible.

23. El procedimiento de la reivindicación 22, que además incluye ajustar el pH de la plasmina acidificada inactiva de manera reversible hasta un pH de entre 2,5 y aproximadamente 4.

25 24. El procedimiento de la reivindicación 16, que además incluye añadir un estabilizante a la disolución de plasmina final.

30 25. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que el estabilizante se selecciona del grupo constituido por aminoácidos, sales o sus combinaciones.

35

40

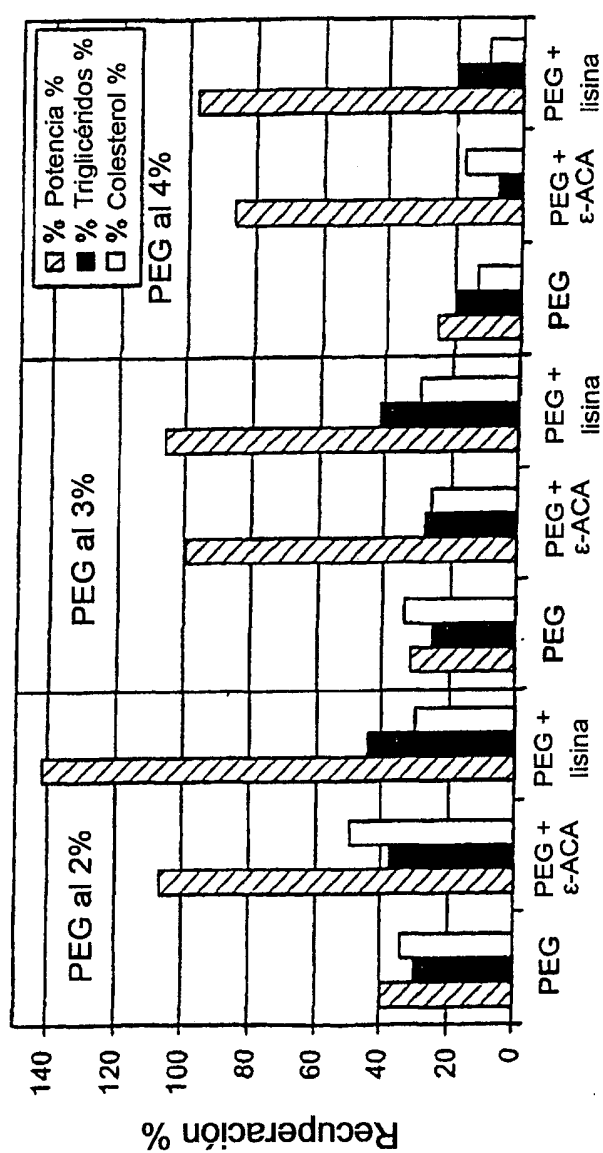
45

50

55

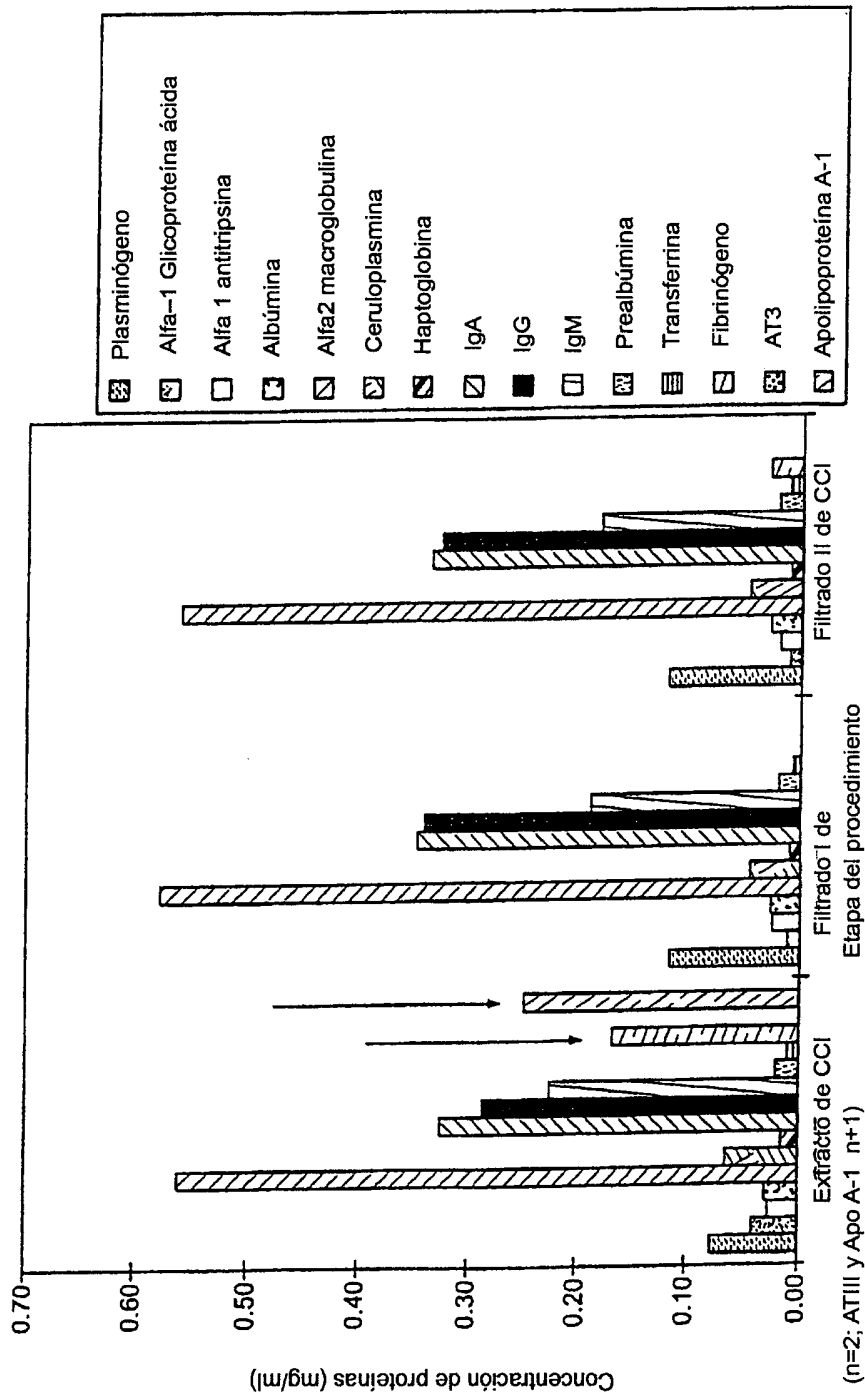
60

65



Efecto de los derivados de lisina sobre la recuperación de plasminógeno y eliminación de lípidos del Filtrado I de CCl<sub>4</sub> a través de precipitación con PEG/filtración en profundidad

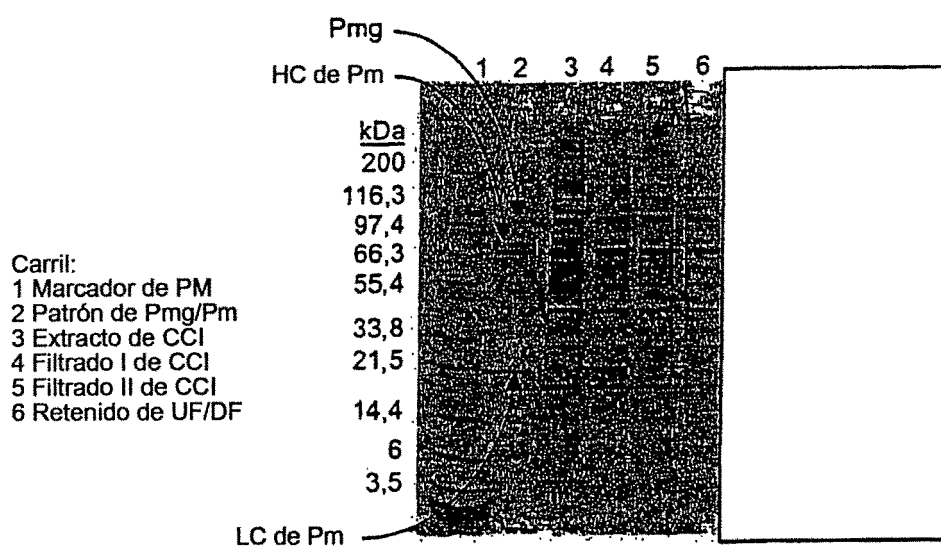
**Fig. 1**



Datos de nefelometría para Extracto de CCI y posteriores Filtrados I y II. Las flechas indican el Fibrinógeno y la Apolipoproteína-1

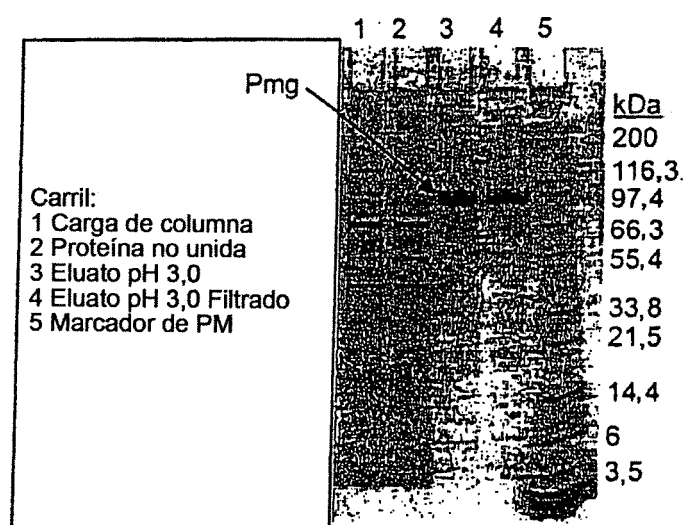
**Fig. 2**





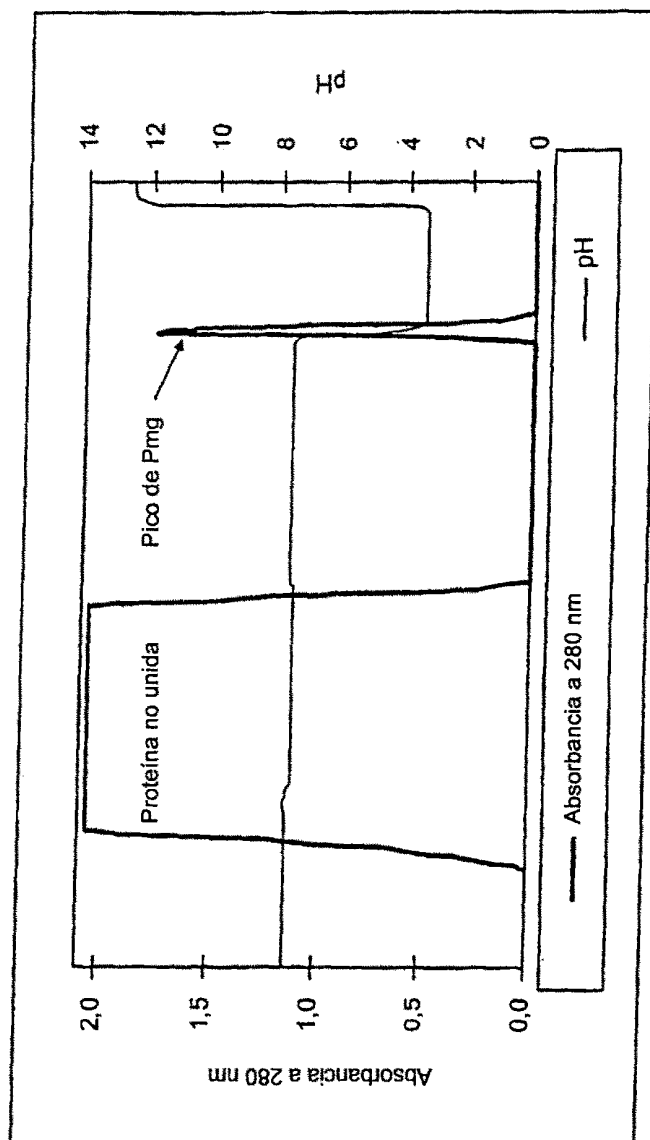
SDS PAGE reducido teñido con Coomassie (Tris-Glicina al 10-20%) del Extracto de CCI, Filtrados y Retenido de UF/DF

**Fig. 3**



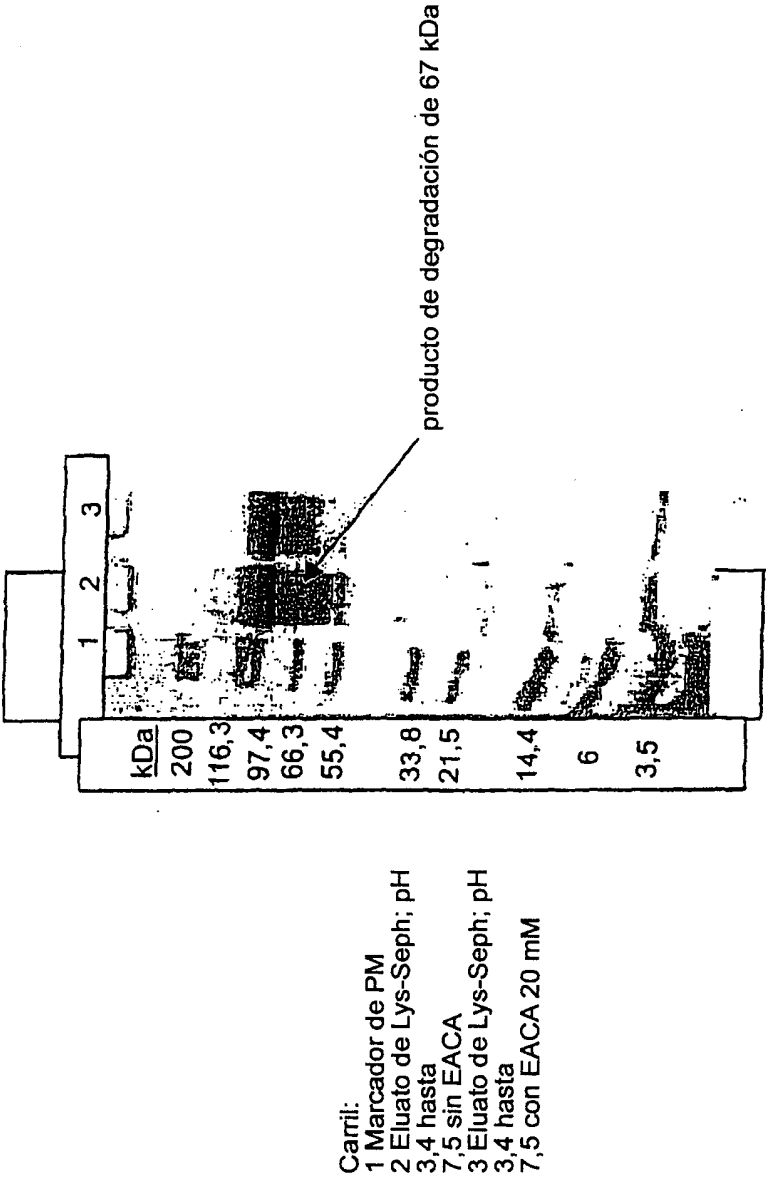
SDS PAGE reducido teñido con Coomassie (Tris-Glicina al 10-20%) de purificación por afinidad de Pmg en Lisina-Sepharose 4B.

**Fig. 4**



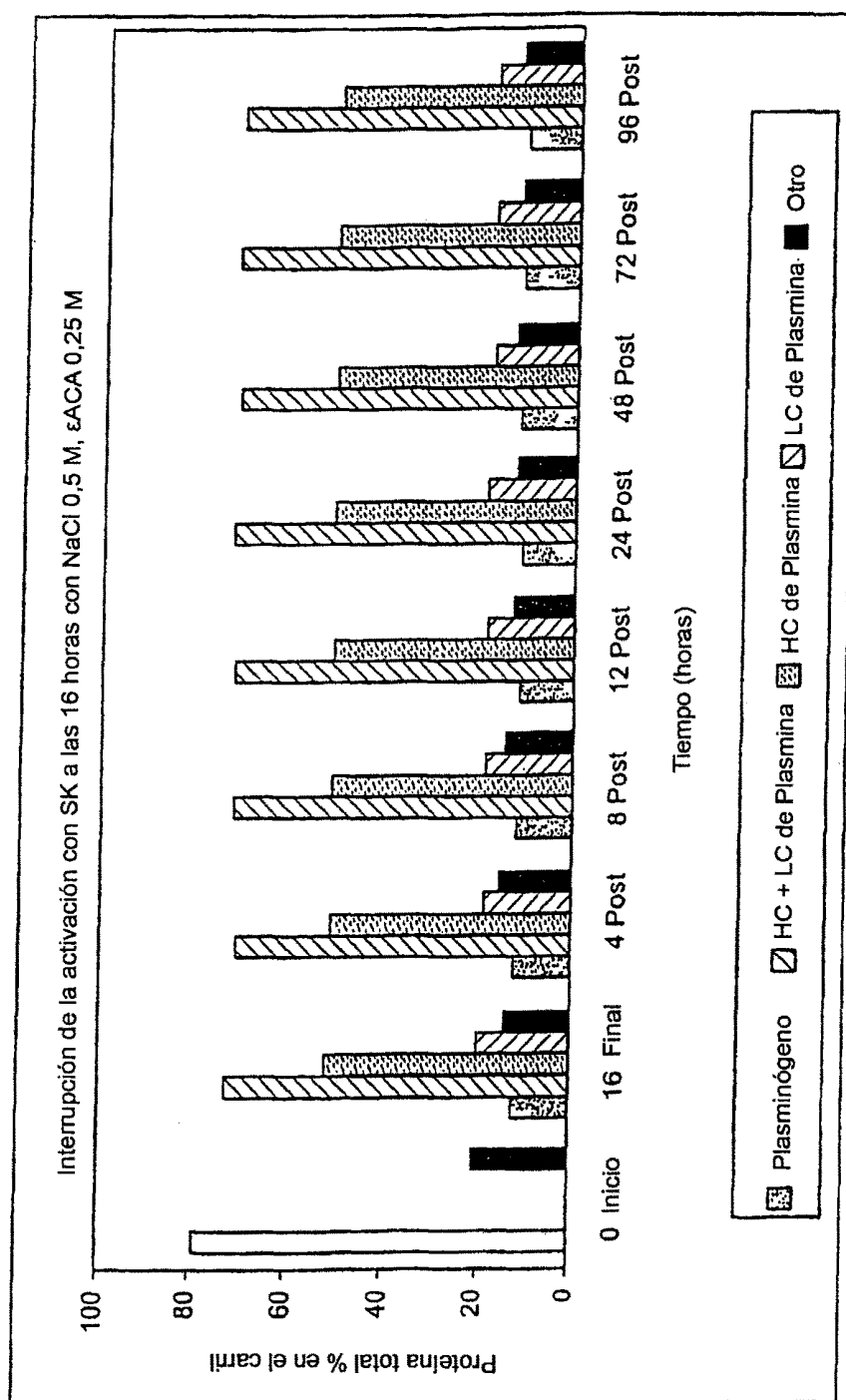
Cromatograma de lisina-Sepharose 4B para la purificación por afinidad de Pmg

**Fig. 5**



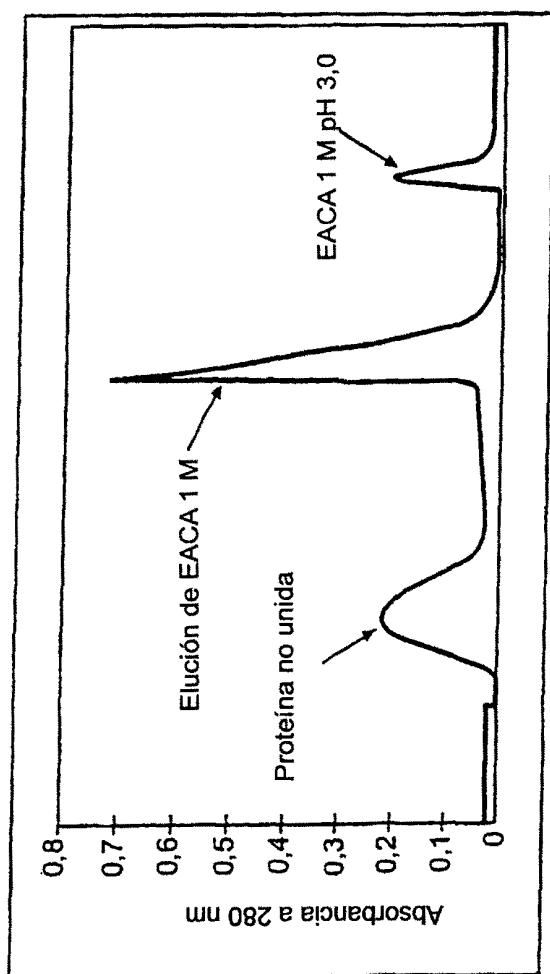
SDS PAGE reducido teñido con Coomassie (Tris, Glicina al 10-20%) del eluato de lisina-Sepharose 4B (Pmg), pH ajustado desde 3,4 hasta 7,5 en presencia o ausencia de EACA

Fig. 6



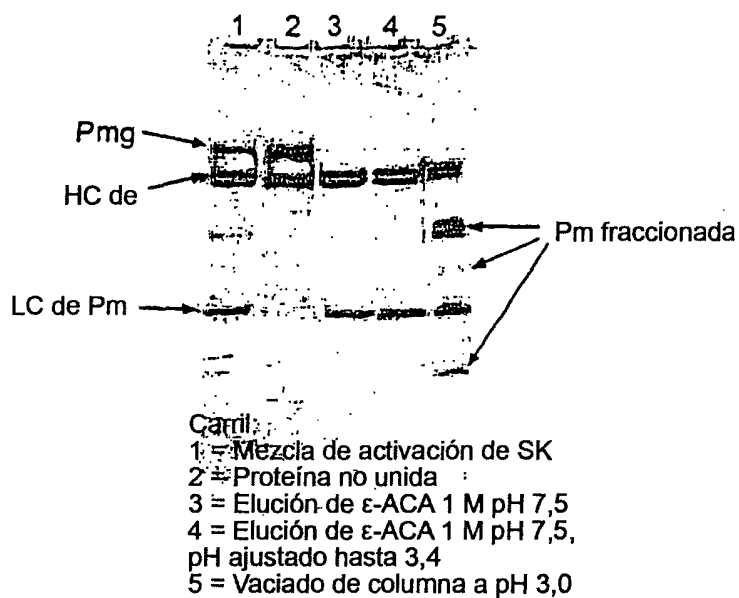
Estabilidad de la disolución de activación con estreptocinasa tras la interrupción con NaCl 0,5 M, ε-ACA 0,25 M

**Fig. 7**



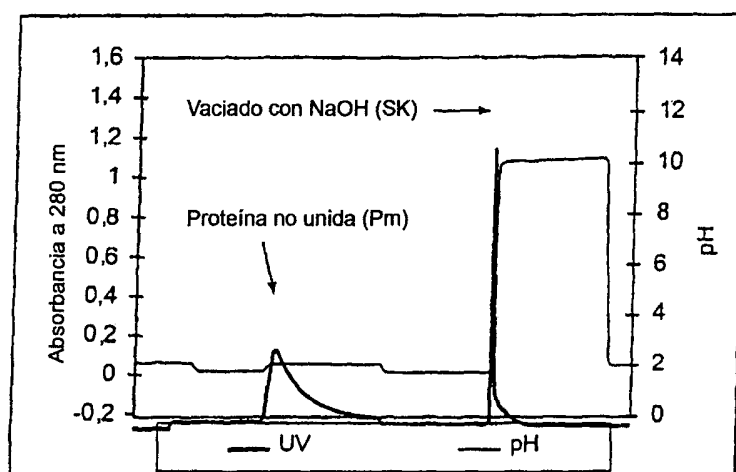
Cromatograma de benzamidina Sepharose 6B para la purificación por afinidad de Pm activada con SK

**Fig. 8**



SDS-PAGE reducido teñido con Coomassie (Tris-Glicina al 10-20%) de la purificación de Pm por afinidad en benzamidina-Sepharose 6B

**Fig. 9**



Cromatograma de la cromatografía de interacción hidrofoba (Octil-Sepharose 4 FF) para eliminar la estreptocinasa.

**Fig. 10**



