

Traduzione del brevetto europeo n. 3512940, dal titolo

" PROCESSO PER LA PURIFICAZIONE DEL PLASMINOGENO A PARTIRE DA
PLASMA UMANO."

a nome: KEDRION S.P.A.

5 con sede: Italia, 55051 Barga - Castelvecchio Pascoli - Località ai Conti

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce al campo degli emoderivati, in particolare alla
10 purificazione e alla produzione del plasminogeno umano.

STATO DELL'ARTE

Il plasminogeno (Pg) è sintetizzato sotto forma di zimogeno ed è convertito nella serina-
proteasi plasmina (Pm) dagli attivatori fisiologici urochinasi (uPA) o attivatore tissutale del
plasminogeno (tPA), causando l'attivazione del sistema fibrinolitico. In effetti, la funzione
15 primaria *in vivo* della Pm è regolare il tono vascolare degradando i trombi contenenti fibrina.

Il principale tessuto che sintetizza plasminogeno è il fegato, tuttavia altre fonti sono state
identificate; esse includono le ghiandole surrenaliche, reni, cervello, testicoli, cuore,
polmone, utero, milza, timo e intestino. Il plasminogeno è sintetizzato come un polipeptide
20 ed è chiamato Glu-Pg. La forma matura del plasminogeno (791 aminoacidi) è dovuta alla
separazione di un peptide leader di 19 aminoacidi durante la secrezione. La conversione
del plasminogeno umano a plasmina coinvolge la rottura del legame Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶² che risulta
nella generazione della Glu-Pm, che contiene una catena pesante N-terminale di 561
aminoacidi e una catena leggera carbossi-terminale di 230 aminoacidi legata con legame
25 disulfidico. La plasmina catalizza l'idrolisi dell'N-terminale del Glu¹-Pg in posizione 77,



convertendo il Glu¹-Pg in un'altra forma di plasminogeno chiamata Lys⁷⁸-Pg. Questa conversione è importante per il massimo incremento nell'attivazione del Glu-Pg sulla superficie cellulare.

La prima documentazione di plasminogeno umano aberrante è stata riportata oltre 25 anni
5 fa per un paziente eterozigote per una deficienza di plasminogeno con una storia di eventi trombotici. Mutazioni in omozigosi o eterozigosi combinata nel gene del plasminogeno generano un'inflammatione severa che provoca un danno alle funzioni visive, quando interessa la cornea, noto come congiuntivite lignea o malattia pseudomembranosa e, in certi casi, idrocefalo occlusivo.

10 Diversi metodi relativi alla purificazione del plasminogeno sono stati precedentemente descritti.

Deutsch D. G. e Mertz E. (Science 1970, 170, 1095-1096) descrivono un metodo di purificazione del plasminogeno da plasma umano basato su una cromatografia per affinità usando la resina Lysine-Sepharose 4B. Un volume di 340 mL di plasma (diluito a 640 mL
15 con acqua) era fatto passare attraverso 150 mL di resina, lavata con buffer fosfato 0.3 M ed EDTA 3 mM, e l'eluizione del plasminogeno era effettuata con acido ϵ -aminocaproico 0.2 M che era rimosso, a freddo, mediante una colonna Sephadex G-25.

Grant A.J. (Biochem. Int. 1990, 20(3), 519-527) descrive un metodo basato su una doppia cromatografia per affinità, in condizioni simili a Deutsch e Mertz. Il processo era condotto a
20 4 °C, aggiungendo inibitori delle proteasi in ciascuno step di purificazione, per prevenire l'attivazione spontanea del plasminogeno a plasmina da parte di attivatori presenti nel plasma.

US3943245 descrive la purificazione del plasminogeno da plasma umano e di mammiferi non umani o dalla Frazione III di Cohn attraverso una cromatografia per affinità modificata



usando la Sepharose-L-lysine con soluzioni buffer ad alta forza ionica, come nella cromatografia a scambio ionico.

EP0638314 descrive la purificazione del plasminogeno a partire dalla frazione II + III di Cohn sottoponendo questa ad uno step di inattivazione virale con solvente/detergente (S/D)

5 prima dello step di cromatografia per affinità su colonna Lysine-Sepharose, che era lavata con una soluzione di glicina allo 0.9% (pH 7.2) contenente sodio cloruro allo 0.9% e 500 mL di soluzione di glicina allo 0.9% (pH 7.2) contenente sodio cloruro 1 M e l'eluizione del plasminogeno adsorbito era condotta con una soluzione di glicina allo 0.9% (pH 7.2) contenente lisina 0.25 M. La preparazione del plasminogeno poi liofilizzato era sottoposta
10 a trattamento al calore a 60 °C - 80 °C per 72 ore o più per produrre una composizione contenente plasminogeno di tipo Lys in cui i virus erano rimossi o inattivati.

Le scopo dell'invenzione è fornire un processo scalabile a livello industriale per ottenere un plasminogeno purificato e viralmente sicuro adatto ad essere somministrato nell'uomo per scopi terapeutici.

15

RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

L'oggetto della presente invenzione è un processo di purificazione del plasminogeno come definito nelle rivendicazioni a partire da plasma umano o da intermedi del frazionamento dello stesso; tale processo comprendente:

ii) uno step di inattivazione virale nel quale il plasma umano è messo a contatto con una
20 miscela di solvente/detergente;

v) un singolo step di cromatografia per affinità su una resina ad agarosio cross-linkato con L-lysina immobilizzata; e

ix) uno step di rimozione virale;

dove la suddetta inattivazione virale (ii) è eseguita a monte della cromatografia per affinità
25 e la suddetta nanofiltrazione (ix) è eseguita a valle della cromatografia per affinità.



Per garantire un prodotto finito adatto alla terapia nell'uomo, oltre al trattamento con solvente/detergente (ii), che garantisce un prodotto sicuro da virus con envelope, la presente invenzione include anche uno step di nanofiltrazione (ix) che protegge la preparazione da piccoli virus con envelope e senza envelope, come ad esempio HAV.

5 Il processo della presente invenzione non richiede alcuna addizione di inibitori delle proteasi. Come precedentemente riportato, i processi tradizionali per la purificazione del plasminogeno suggeriscono l'utilizzo di inibitori delle proteasi (es. aprotinina, PMSF e l'inibitore della tripsina di soia) per prevenire l'attivazione spontanea del plasminogeno a plasmina da parte di attivatori presenti nel plasma. Nel presente metodo, al contrario, non
10 viene aggiunto alcun agente conservante ed è ottenuto un plasminogeno completamente funzionante in totale assenza di inibitori delle proteasi.

Secondo la presente invenzione, una preparazione di plasminogeno viralmente inattivato e altamente puro è ottenuta a partire da plasma umano o da un intermedio del frazionamento dello stesso. Il metodo di purificazione qui descritto è efficiente, riproducibile e scalabile a
15 livello industriale, permettendo di produrre Glu-plasminogeno funzionante ed integro senza aggiungere alcun inibitore delle proteasi come agente conservante.

Grazie alle specifiche interazioni tra la resina e la proteina target, la presente invenzione fornisce un metodo basato su una singola cromatografia, sufficiente ad ottenere una preparazione di plasminogeno altamente puro. L'alto livello di purezza rende questa
20 composizione di plasminogeno adatta all'uso nel trattamento di patologie umane dovute a deficienza genetica di plasminogeno.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Lo schema a blocchi del metodo dell'invenzione è descritto interamente in Figura 1.

Secondo l'invenzione, il materiale di partenza può essere plasma umano o intermedi del
25 frazionamento dello stesso dove per intermedi del frazionamento si intende crioprecipitato,

Frazione di Cohn III o Frazione di Cohn II + III. Per un aspetto particolarmente preferito e vantaggioso, il materiale di partenza per la purificazione del plasmonogeno è una fonte congelata di plasma. Preferibilmente,

nello step iniziale della produzione il plasma umano congelato viene scongelato in
5 agitazione continuativa fino a che è raggiunta una temperatura di 20 ± 1 °C e il pH è
aggiustato a 7.0 - 8.0 con CO₂ o N₂ pressurizzati.

Secondo l'invenzione, il plasma scongelato è preferibilmente chiarificato mediante uno step di filtrazione (i) su un filtro da 1 µm e successivamente è sottoposto allo step di inattivazione virale (ii) mettendo a contatto la soluzione con una miscela di solvente/detergente (S/D).

10 Questo step ha l'obiettivo di garantire un prodotto finito sicuro da virus con envelope. Per un aspetto preferito la miscela S/D ha la seguente composizione: 1% w/w di Triton X-100 e 1% w/w di tri-(n-butil)-fosfato (TnBP). Preferibilmente, la miscela è aggiunta al plasma a 30 °C ± 1 °C e agitata per 30 minuti. Il trattamento S/D è condotto per almeno sei ore a 28 °C ± 1 °C; durante il trattamento, il pH è monitorato ed eventualmente è aggiustato a 7.0 - 8.0.

15 Per facilitare la separazione della miscela S/D dal plasma, alla fine dello step di inattivazione virale (ii), è preferibilmente incluso uno step di addizione del Castor Oil (iii). In un esempio preferito, la concentrazione del Castor Oil è 3 - 5% del plasma S/D; esso è aggiunto a 20 °C ± 1 °C e agitato per 60 minuti, poi la soluzione è lasciata per almeno 1 ora allo scopo di separare la fase S/D dalla fase del plasma. L'addizione del Castor Oil ha l'obiettivo di
20 migliorare la filtrabilità del plasma, riducendo il rischio di caricare il S/D all'interno della colonna durante la successiva cromatografia, preservando quindi l'integrità della resina.

Alla fine del suddetto step (iii), il plasma è preferibilmente sottoposto ad uno step di filtrazione (iv) e quindi filtrato attraverso un filtro di profondità da 3.00 - 0.5 µm.

Il successivo step di cromatografia per affinità (v) è preferibilmente eseguito sulla resina per
25 affinità ECH-Lysine Sepharose 4 Fast Flow che è basata su un agarosio al 4% altamente

né nella concentrazione del ligando né nella capacità di legame del plasminogeno, fatta eccezione per una lunga esposizione a condizioni fortemente basiche.

Per la scalabilità industriale del metodo, è importante che la resina abbia un'elevata capacità di legame, allo scopo di massimizzare la resa del prodotto finito. Come mostrato
5 nella parte sperimentale, sulla resina ECH-Lysine Sepharose 4 Fast Flow è possibile caricare fino a 38 volumi di colonna (CV) di plasma inattivato. Dunque, in un esempio preferito, 30 - 35 CV rappresentano il volume di caricamento ottimale per ottenere un'alta resa di plasminogeno, evitando la saturazione resina.

Secondo un aspetto particolare, il materiale di partenza è caricato all'interno della colonna
10 ad un flusso lineare di 150 - 250 cm/h con valori di pressione ≤ 0.1 MPa. Valori di flusso più bassi implicano un lungo tempo di caricamento, certamente non adatto alla scalabilità industriale del metodo.

In un esempio preferito, i buffer usati per la cromatografia per affinità sulla resina ECH-Lysine Sepharose 4 Fast Flow sono i seguenti:

15 sodio fosfato 0.05 M, sodio cloruro 0.1 M, pH 7.4 per il condizionamento della resina;
sodio fosfato 0.05 M, sodio cloruro 0.1 M, pH 7.4 per il lavaggio della resina;
sodio fosfato 0.05 M, acido ϵ -aminocaproico 0.05 M, sodio cloruro 0.1 M, pH 7.4 per l'eluizione del plasminogeno.

Come mostrato nella parte sperimentale, i buffer di cui sopra (composizione dei buffer B)
20 usati nello step di cromatografia per affinità (v), comparati con altri buffer testati (composizione dei buffer A), permettono di ottenere una maggiore resa di plasminogeno.

Per eliminare eventuali particolati, il prodotto cromatografico dello step (v) è preferibilmente sottoposto ad uno step di filtrazione (vi) attraverso un filtro da 0.22 μm , poi la purificazione del plasminogeno preferibilmente procede con uno step di ultrafiltrazione (vii), che rende
25 possibile ottenere una soluzione proteica concentrata e dializzata adatta per la

somministrazione oculare. In particolare, l'ultrafiltrazione (vii) è eseguita con 20 - 25 volumi di soluzione salina (sodio cloruro 0.1 M) usando cassette per dialisi da 30,000 Dalton per rimuovere l'acido ϵ -aminocaproico; poi il sistema viene lavato con sodio cloruro 0.1 M per ottenere una concentrazione proteica pari a 0.7 ± 1.3 mg/mL.

- 5 Dopo aver aggiustato il pH a 7.1 ± 0.7 , la soluzione di plasminogeno è preferibilmente sottoposta ad uno step di filtrazione (viii) attraverso un filtro da $0.1 \mu\text{m}$ e successivamente allo step di rimozione virale (ix), chiamato nanofiltrazione. Per un aspetto preferito, la nanofiltrazione (ix) prevede una filtrazione attraverso un filtro per virus da 20 nanometri. La preparazione è poi preferibilmente sottoposta a filtrazione sterilizzante (x) attraverso un
10 filtro da $0.22 \mu\text{m}$ e il bulk di plasminogeno così ottenuto viene conservato ad una temperatura $\leq -20^\circ\text{C}$.

Oltre al trattamento con solvente/detergente (ii) che garantisce un prodotto sicuro da virus con envelope, lo step di nanofiltrazione (ix) protegge da piccoli virus con envelope e senza envelope, come ad esempio HAV. Questa procedura di rimozione virale di certo permette
15 un miglioramento del processo di purificazione del plasminogeno in confronto a quanto precedentemente descritto in letteratura.

Come riportato da Grant, i processi tradizionali di purificazione suggeriscono l'utilizzo di inibitori delle proteasi (es. aprotinina, PMSF e l'inibitore della tripsina di soia), allo scopo di garantire l'integrità del plasminogeno nel prodotto finito e prevenire la sua attivazione. Il
20 presente metodo, invece, permette di ottenere un plasminogeno completamente funzionante senza aggiungere alcun agente conservante, evitando quindi gli effetti avversi di questi ultimi. Il plasminogeno preserva totalmente la sua integrità e, come mostrato nella parte sperimentale, uno studio di comparabilità tra il plasminogeno ottenuto con o senza aprotinina dimostra che non esistono differenze né in termini di antigene del plasminogeno
25 né in termini di attività e resa.



Per un altro aspetto preferito, la preparazione di plasminogeno qui descritta è principalmente nella forma di Glu-Pg, che rappresenta la forma predominante di plasminogeno nel plasma. L'emivita del Glu-Pg in circolo è nettamente più alta di quella del Lys-Pg, per cui la presente invenzione fornisce un metodo per ottenere una preparazione
5 di plasminogeno adatta alla terapia nell'uomo.

Ulteriori dettagli descrittivi sono forniti negli esempi riportati di seguito. Tali esempi sono utili per chiarire il metodo e non lo limitano in nessun modo.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

La **Figura 1** mostra lo schema a blocchi di un esempio preferito del processo
10 dell'invenzione, a partire dal materiale grezzo fino ad ottenere il prodotto finito del plasminogeno.

La **Figura 2** mostra la massima capacità di carico, in termini di Volumi di Colonna (CV), della resina ECH-Lysine Sepharose 4 Fast Flow. L'attività del plasminogeno è stata valutata sul flow-through fino a che raggiungeva almeno il 10% dell'attività
15 inizialmente trovata nel pool plasma.

La **Figura 3** mostra una SDS-PAGE rappresentativa dello step cromatografico eseguito mediante l'utilizzo della composizione dei buffer A vs la composizione dei buffer B come riportato in tabella 2.

La **Figura 4** mostra un Western Blot rappresentativo ottenuto in presenza o assenza di
20 aprotinina mediante utilizzo della composizione dei buffer cromatografici A vs la composizione dei buffer B

PARTE SPERIMENTALE

Esempio 1 – Capacità legante della resina in termini di Volumi di Colonna (CV)

Uno degli aspetti più importanti di una cromatografia scalabile a livello industriale è un'elevata capacità legante, con lo scopo di massimizzare la resa, senza alterare la funzionalità del prodotto.

Per identificare la massima capacità di legame della ECH-Lysine Sepharose 4 Fast Flow
5 (impaccata in una colonna da 16 mm di diametro con un'altezza pari a 15 ± 1 cm, dove 1 CV era 30 mL), 1.3 Kg di plasma S/D, sottoposto ad addizione di Castor Oil e successivamente filtrato attraverso un filtro di profondità 3.00 - 0.5 μ m, sono stati caricati in suddetta resina a 50 cm/h; l'attività del plasminogeno nel flow-through (FT) è stata analizzata fino a che ha raggiunto almeno il 10% dell'attività inizialmente trovata nel pool-
10 plasma. Come mostrato in Figura 2 non è stata osservata alcuna attività del plasminogeno nel FT fino a 38 CV, mentre è stata registrata a partire da 39 CV. Esperimenti eseguiti caricando 10 o 32 CV hanno dimostrato che non ci sono differenze significative né in termini di antigene del plasminogeno né in termini di attività nella frazione di eluizione, chiamata PLG1 (tabella 1). Per questo motivo si è stabilito che la capacità di legame della ECH-
15 Lysine Sepharose 4 Fast Flow è 38 CV, tuttavia il volume da caricare, che assicuri un'elevata resa di plasminogeno evitando la saturazione della resina, è stato fissato tra 30 e 35 CV. Secondo tali esperimenti la capacità di legame è risultata essere tra 3 e 3.5 mg di plasminogeno per mL di resina.

20 **Esempio 2 – Ottimizzazione delle condizioni di caricamento ed eluizione**

Lo step di caricamento cromatografico è stato inizialmente eseguito a 50 cm/h. Questa velocità di flusso, per alti volumi di caricamento (30 - 35 CV), implica una lunga durata della cromatografia, non adatta a processi industriali. A tal proposito, il flusso di caricamento è stato incrementato fino a 200 cm/h, mantenendo una bassa pressione, quindi riducendo la
25 durata dello step da 7 ore a meno di 2 ore. In queste condizioni, si osservava una riduzione

della resa del plasminogeno dall'80.35% al 70% (Tabella 1) per cui è stato necessario indagare ulteriori ottimizzazioni riguardanti la composizione dei buffer.

La composizione dei buffer inizialmente utilizzata, chiamata composizione A, è stata sostituita con la composizione B, che differiva principalmente per l'assenza di EDTA (Tabella 2); volume di caricamento e flussi erano lasciati inalterati. Come mostrato in Tabella 1, l'utilizzo della composizione dei buffer B ha ridotto la perdita di plasminogeno nella frazione di lavaggio e, allo stesso tempo, ha migliorato significativamente la resa di plasminogeno nella frazione di eluizione fino al 90.40%. Questo risultato è stato confermato dall'analisi di elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE) (Figura 3): lo step di lavaggio condotto con la composizione dei buffer A ha mostrato una banda in corrispondenza del peso molecolare del plasminogeno, a dimostrazione della perdita di plasminogeno durante questo step; tale banda non è stata visibile nel caso del lavaggio eseguito con la composizione dei buffer B. Inoltre, la composizione dei buffer B ha incrementato significativamente la rimozione del principale contaminante albumina nello step di lavaggio, riducendo quindi il contenuto di quest'ultima nella frazione di eluizione (Tabella 1).

Le condizioni cromatografiche ottimizzate erano le seguenti: 30 - 35 CV come volume di caricamento; 200 cm/h di flusso; composizione dei buffer B.

Tabella 1. Cromatografia condotta in diverse condizioni di volume di caricamento, velocità di flusso, composizione dei buffer, presenza o assenza di aprotinina. I risultati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti separati, eseguiti in triplicato

PURIFICAZIONE IN PRESENZA DI APROTININA										
Buffer	CV	Flusso	Campione	PLG (IU/mL)		PLG (g/L)		Albumina (g/L)		Resa PLG
				Media	SD	Media	SD	Media	SD	
A	10	50 cm/h	Pool Plasma	0,91	0,01	0,12	0,01	32	0,14	80,50 ± 6,0 %
			FT	-	-	-	-	28,55	0,07	
			WASH	-	-	-	-	0,023	0,0019	
			PLG1	11,62	0,01	1,49	0,02	0,009	0,0001	
PURIFICAZIONE IN PRESENZA DI APROTININA										
Buffer	CV	Flusso	Campione	PLG (IU/mL)		PLG (g/L)		Albumina (g/L)		Resa PLG
				Media	SD	Media	SD	Media	SD	
A	32	50 cm/h	Pool Plasma	0,82	0,01	0,11	0,01	34,75	0,21	80,35 ± 5,5 %
			FT	-	-	-	-	34,5	1,6	
			WASH	0,1	0,01	0,01	0	0,266	0,0028	
			PLG1	14,14	0,2	1,78	0,03	0,012	0,0003	
PURIFICAZIONE IN PRESENZA DI APROTININA										
Buffer	CV	Flusso	Campione	PLG (IU/mL)		PLG (g/L)		Albumina (g/L)		Resa PLG
				Media	SD	Media	SD	Media	SD	
A	32	200 cm/h	Pool Plasma	0,9	0,01	0,11	0	31,5	0	70,00 ± 5,1 %
			FT	-	-	-	-	31,65	0,49	
			WASH	0,33	0,01	0,03	0	0,084	0,0022	
			PLG1	12,46	0,2	1,38	0,01	0,008	0,0002	
PURIFICAZIONE IN PRESENZA DI APROTININA										
Buffer	CV	Flusso	Campione	PLG (IU/mL)		PLG (g/L)		Albumina (g/L)		Resa PLG
				Media	SD	Media	SD	Media	SD	
B	32	200 cm/h	Pool Plasma	0,88	0,02	0,11	0	35,3	0,14	90,40 ± 6,2 %
			FT	-	-	-	-	34,3	0,28	
			WASH	0,14	0,01	0,01	0	0,561	0,0014	
			PLG1	18,48	0	2,1	0	-	-	
PURIFICAZIONE IN ASSENZA DI APROTININA										
Buffer	CV	Flusso	Campione	PLG (IU/mL)		PLG (g/L)		Albumina (g/L)		Resa PLG
				Media	SD	Media	SD	Media	SD	
B	32	200 cm/h	Pool Plasma	0,85	0,01	0,1	0	35,6	0,57	88,00 ± 5,8 %
			FT	-	-	-	-	34,2	0,14	
			WASH	0,08	0	-	-	0,431	0,0014	
			PLG1	15,54	0,2	1,65	0,02	0,004	0,00004	

Tabella 2. Due diverse composizioni dei buffer cromatografici, chiamate composizione A e composizione B

Step Cromatografico	Buffer	Composizione dei buffer A	Composizione dei buffer B
Condizionamento	1	Sodio fosfato 0.05 M, EDTA 0.003 M, pH 7.4	Sodio fosfato 0.05 M, sodio cloruro 0.1 M , pH 7.4
Lavaggio	2	Sodio fosfato 0.05 M, sodio cloruro 0.4 M, EDTA 0.003 M, pH 7.4	Sodio fosfato 0.05 M, sodio cloruro 0.1 M , pH 7.4
Eluizione	3	Sodio fosfato 0.05 M, acido ϵ -aminocaproico 0.2 M, pH 7.4	Sodio fosfato 0.05 M, acido ϵ -aminocaproico 0.05 M, sodio cloruro 0.1 M, pH 7.4

5 **Esempio 3 – Presenza o assenza di un inibitore delle proteasi**

Allo scopo di stabilire se il metodo permetteva di ottenere un plasminogeno totalmente funzionante in assenza di qualsiasi agente conservante, come gli inibitori delle proteasi, la purificazione è stata condotta sia con che senza addizione di aprotinina bovina (20 KIU/mL) al plasma scongelato prima di eseguire la filtrazione chiarificante a 1 μ m. Come mostrato in Tabella 1 l'assenza di aprotinina non ha alterato l'antigene del plasminogeno, l'attività e la resa; inoltre, nonostante si sia osservato un incremento del contenuto di albumina nella frazione di eluizione, questo non è risultato significativo. La Figura 4 mostra i risultati ottenuti dall'analisi di Western Blot relativa alla cromatografia condotta in presenza o assenza di aprotinina mediante composizione dei buffer A vs composizione B: nessuno dei campioni analizzati ha mostrato la banda attivazione corrispondente alla plasmina dimostrando che, anche in assenza di aprotinina, il plasminogeno preservava totalmente la sua integrità

Esempio 4 - ELISA per il Glu-Pg

È ben noto che l'emivita del Glu-Pg circolante nel plasma è di gran lunga superiore a quella dell'altra forma di plasminogeno chiamata Lys-Pg. Per studiare la forma di plasminogeno ottenuta nella presente invenzione, è stato eseguito un saggio immuno-assorbente legato ad un enzima (ELISA) sul prodotto finito mediante utilizzo di un anticorpo specifico capace di riconoscere soltanto la forma Glu-Pg. Come mostrato in Tabella 3, questi esperimenti hanno dimostrato che la purificazione cromatografica eseguita con la composizione dei buffer B, sia in presenza che in assenza di aprotinina, ha fornito un prodotto finito del quale più del 98% del plasminogeno era nella forma Glu-Pg.

Tabella 3. ELISA per il Glu-Pg. I risultati sono espresso come media \pm SD di tre esperimenti separati eseguiti in triplicato

Descrizione del Campione	Pg (mg/mL)		Glu-Pg (mg/mL)		Glu-Pg/Pg
	Media	SD	Media	SD	
PLG con composizione dei buffer A	1,38	0,01	1,24	0,12	89,8 %
PLG con composizione dei buffer B	2,10	0,00	2,07	0,15	98,6 %
PLG con composizione dei buffer B in assenza di aprotinina	1,65	0,02	1,70	0,05	103,0 %

15

Esempio 5 – Miglior realizzazione del processo

Plasma umano congelato (1.88 Kg) è stato scongelato sotto agitazione continua fino a che la temperatura ha raggiunto i 20 °C. Il pH è stato aggiustato a 7.5 con CO₂ e, dopo filtrazione su un filtro da 1 μ m, 1.74 Kg di plasma scongelato sono stati sottoposti allo step di inattivazione virale: la miscela S/D, composta da 1% w/w di

Triton X-100 (17.44 g) e 1% w/w di TnBP (17.44 g), è stata aggiunta a 30 °C e agitata per 30 minuti. Il trattamento con S/D è stato condotto per sei ore a 28 °C e, al termine di questo tempo, 65.8 g di Castor Oil (3.7% del plasma S/D) sono stati aggiunti a 20°C sotto agitazione per 60 minuti; successivamente la soluzione è stata
5 lasciata per 1 ora allo scopo di separare la fase S/D dalla fase del plasma. Dopo filtrazione attraverso un filtro di profondità da 3.00 - 0.5 µm, 1.0 Kg di plasma S/D è stato caricato sulla resina di affinità ECH-Lysine Sepharose 4 Fast Flow (impaccata all'interno di una colonna da 16 mm di diametro e 15 cm di altezza). Il quantitativo di plasma caricato corrispondeva a 33 CV; la velocità di flusso lineare era 200 cm/h
10 e i buffer utilizzati erano quelli descritti in Tabella 2 (composizione B).

Il prodotto cromatografico (0.035 Kg) è stato filtrato attraverso un filtro da 0.22 µm e, per eliminare l'acido ε-aminocaproico, è stata effettuata una ultrafiltrazione con 20 – 25 volumi di soluzione salina (sodio cloruro 0.1 M) utilizzando cassette per dialisi da 30,000 Dalton. Successivamente, il sistema è stato lavato con una
15 soluzione di sodio cloruro 0.1 M aggiustando la concentrazione proteica a 1.2 mg/mL, e la soluzione di plasminogeno così ottenuta (0.07 Kg), è stata filtrata usando un filtro da 0.1 µm. Successivamente è stato eseguito lo step di rimozione virale sottoponendo la soluzione a nanofiltrazione da 20 nanometri per virus su un filtro Planova 20N, dopo una filtrazione sterilizzante finale, la preparazione bulk di
20 plasminogeno (0.07 Kg) è stata conservata alla temperatura di -20 °C.

Più del 98% del plasminogeno ottenuto era Glu-Pg.



RIVENDICAZIONI

1. Un processo di purificazione del plasminogeno in forma nativa (Glu-Pg) a partire da plasma umano o un intermedio del frazionamento dello stesso; il suddetto metodo comprendente:

- 5 ii) uno step di inattivazione virale nel quale il plasma umano è messo a contatto con una soluzione di solvente/detergente;
- v) un singolo step di cromatografia per affinità su resina ad agarosio cross-linkato con L-lysina immobilizzata in cui il buffer di eluizione contiene sodio fosfato 0.05 M, acido ϵ -aminocaproico 0.05 M, sodio cloruro 0.1 M pH 7.4; e
- 10 ix) uno step di rimozione virale mediante nanofiltrazione;
- dove la suddetta inattivazione virale (ii) è eseguita a monte della cromatografia per affinità e la suddetta nanofiltrazione (ix) è eseguita a valle della cromatografia per affinità; in cui non è impiegato alcun inibitore delle proteasi.
2. Il processo secondo la rivendicazione 1, comprendente inoltre uno step di
- 15 addizione di castor oil (iii) che è eseguito successivamente allo step di inattivazione virale (ii) e prima dello step di cromatografia per affinità (v).
3. Il processo secondo le rivendicazioni 1-2, comprendente inoltre uno step di ultrafiltrazione (vii) eseguito a valle della suddetta cromatografia per affinità (v) e a monte della suddetta nanofiltrazione (ix).
- 20 4. Il processo secondo le rivendicazioni 1-3, in cui la miscela di solvente/detergente usata nello step (ii) ha la seguente composizione: 1% w/w di Triton X-100 e 1% w/w di tri-(n-butil)-fosfato (TnBP).
5. Il processo secondo le rivendicazioni 1-4 in cui la resina per la cromatografia per affinità è la ECH-Lysine Sepharose 4 Fast Flow.



6. Il processo secondo la rivendicazione 5 in cui i buffer usati per la cromatografia per affinità sulla resina ECH-Lysine Sepharose 4 Fast Flow sono i seguenti:

5 sodio fosfato 0.05 M, sodio cloruro 0.1 M, pH 7.4 per il condizionamento della resina;

sodio fosfato 0.05 M, sodio cloruro 0.1 M pH 7.4 per il lavaggio della resina;

sodio fosfato 0.05 M, acido ϵ -aminocaproico 0.05 M, sodio cloruro 0.1 M pH 7.4 per l'eluizione del plasminogeno.

7. Il processo secondo le rivendicazioni 1-6 in cui lo step di nanofiltrazione (ix)
10 è eseguito attraverso un filtro per virus da 20 nanometri.

8. Il processo secondo le rivendicazioni 1-7 in cui il materiale di partenza è plasma congelato.

15 Repubblica di San Marino, 13 febbraio 2025

Si certifica che detta traduzione è perfettamente conforme al testo originale.

Dr. Diego Pallini Geryasi

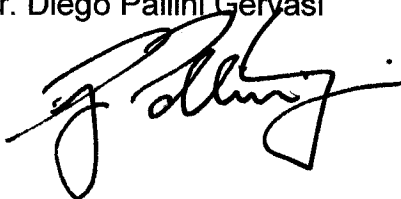


FIG. 1

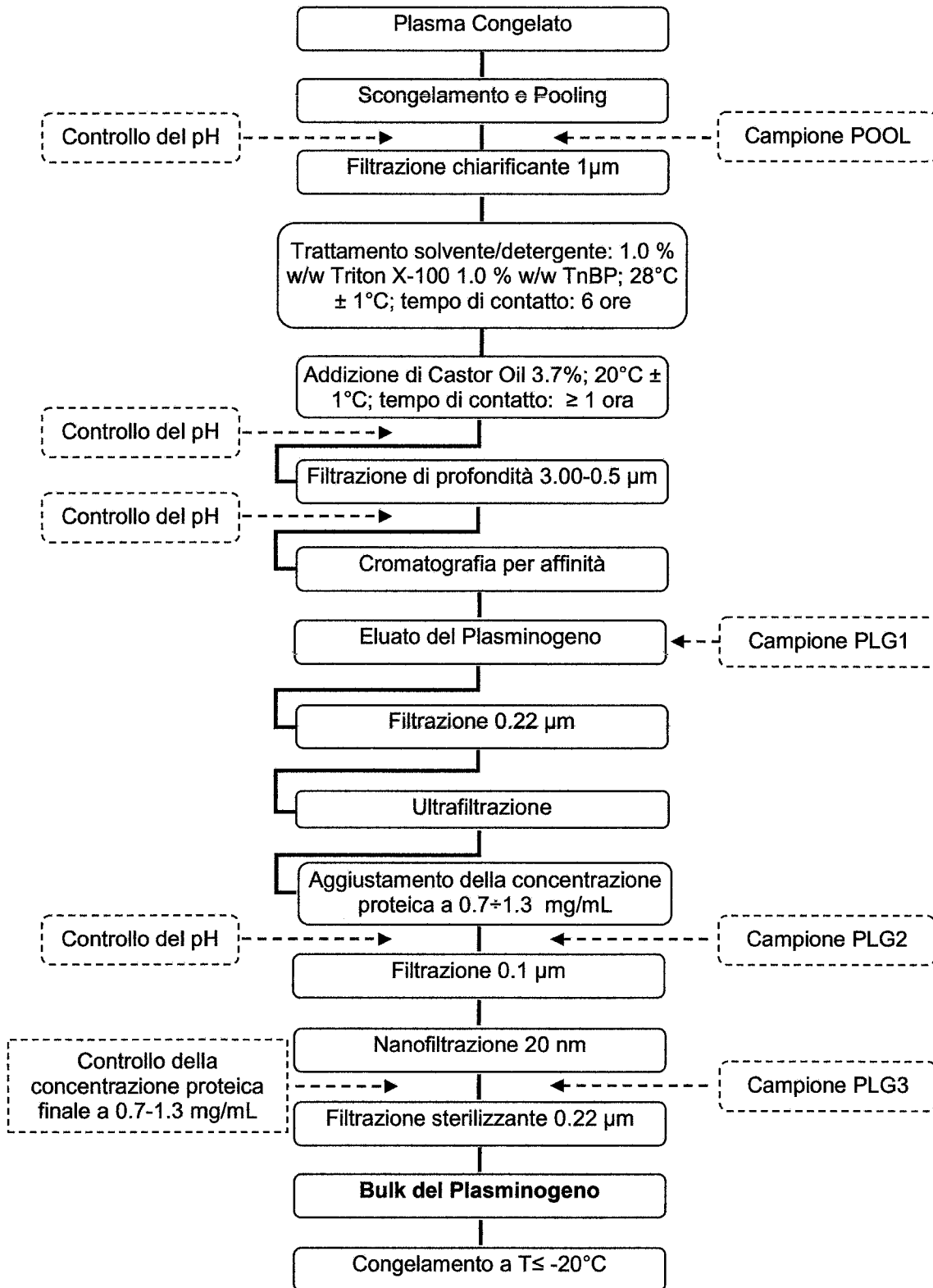


FIG. 2

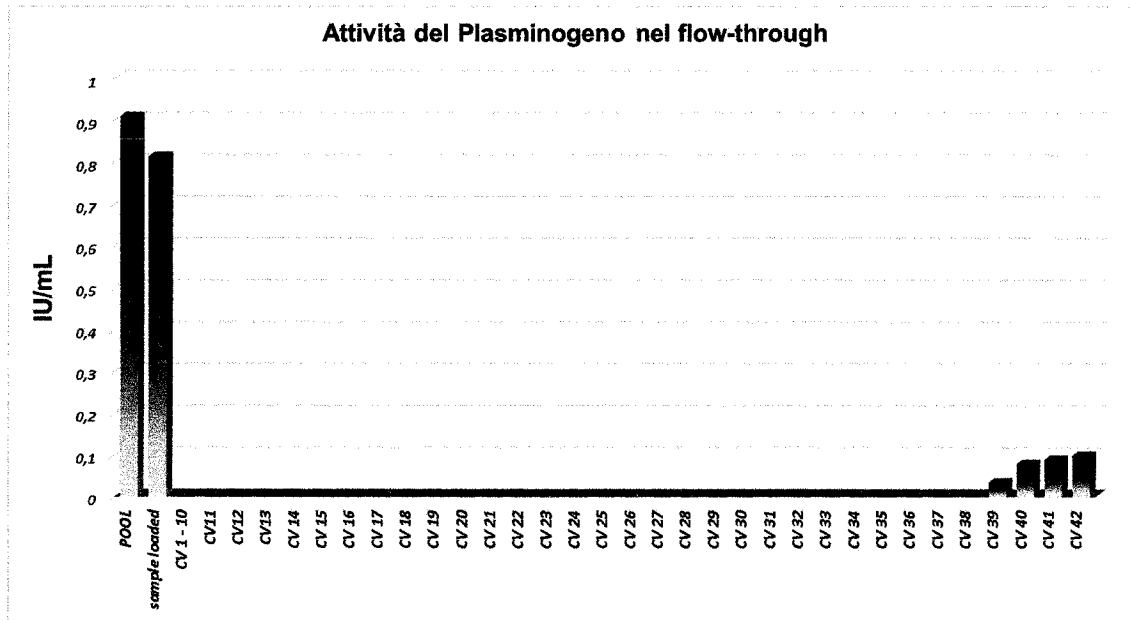
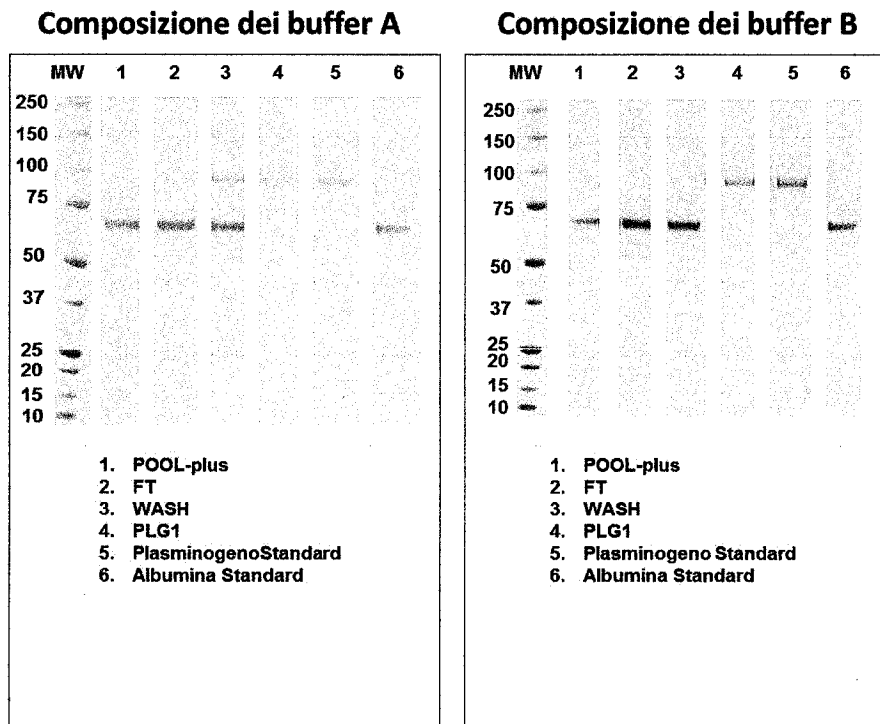


FIG. 3



Handwritten signature

FIG. 4

