



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 332 780**

(51) Int. Cl.:

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 14/75 (2006.01)

C12N 9/68 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03738326 .2**

(96) Fecha de presentación : **07.07.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1519944**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **06.04.2005**

(54) Título: **Procedimientos para la fabricación de fibrinógeno.**

(30) Prioridad: **10.07.2002 GB 0216001**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.02.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.02.2010

(73) Titular/es: **NHS Blood and Transplant
Oak House Reeds Crescent
Watford WD24 4QN, GB**

(72) Inventor/es: **Kingsland, Sarah;
Clemmitt, Robert;
Evans, David y
Feldman, Peter**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Procedimientos para la preparación de fibrinógeno.

5 La presente invención se refiere a procedimientos para la purificación del fibrinógeno, y a preparados de fibrinógeno fácilmente solubles.

10 El fibrinógeno es una proteína del plasma sanguíneo que está implicada en la formación de coágulos. Se convierte en el monómero fibrina por la acción de la proteasa del plasma trombina. Los monómeros de fibrina se agrupan para formar un coágulo débil y después se entrecruzan por la acción del factor XIII activado (es decir, el factor XIIIa) para formar un coágulo más fuerte. El fibrinógeno se usa en terapia en combinación con trombina en los llamados sellantes de fibrina, para conseguir la hemostasis, para cerrar las heridas y para la adhesión controlada del tejido. Los concentrados de fibrinógeno se usan también para el tratamiento de terapia de reemplazo de pacientes con déficit de fibrinógeno (afibrinogenemia), que puede ser heredado o adquirido.

15 Para todas las aplicaciones clínicas, es importante tener fibrinógeno muy puro con el fin de minimizar cualquier posible efecto secundario no deseable resultante, por ejemplo, de la presencia de proteínas contaminantes no deseadas. En particular, es deseable que los preparados de fibrinógeno para uso clínico estén exentos de plasminógeno y plasmina (Blomback B., Blomback M., "Purification of human and bovine fibrinogen", Arkiv for Kemi 1956; 10: 415-443, y Mosesson M. W., "The preparation of human fibrinogen free of plasminogen", Biochim Biophys Acta 1962, 57: 204-213). El plasminógeno es el precursor inactivo de la plasmina, una enzima fibrinolítica que digiere los coágulos de fibrina. Por consiguiente, la presencia de plasminógeno en un preparado de fibrinógeno destinado a ser usado *in vivo* es indeseable a causa de que cualquier posible plasmina generada a partir del plasminógeno en el sitio de la formación del coágulo puede entonces desestabilizar el coágulo.

25 El plasminógeno tiende a copurificarse con el fibrinógeno y su eliminación puede ser dificultosa. Algunos preparados clínicos de fibrinógeno contienen por tanto agentes antifibrinolíticos para inhibir cualquier posible plasmina o plasminógeno presentes (p. ej. aprotinina, una proteína bovina inhibidora de la plasmina; o ácido tranexámico, un inhibidor sintético de la plasmina asociado también con efectos secundarios neurotóxicos). Una ventaja de separar el plasminógeno del fibrinógeno es que entonces no hay necesidad de usar tales inhibidores fibrinolíticos en el preparado clínico de fibrinógeno.

30 Además, es muy deseable que el fibrinógeno derivado de fuentes humanas o animales sea tratado para inactivar cualquier virus de la sangre que puede estar presente, por ejemplo virus de la hepatitis o HIV. Se conocen en la técnica varios métodos de inactivación de virus, incluyendo pasteurización, tratamiento térmico en seco y tratamiento con disolvente-detergente (Pathogen Inactivation of Labile Blood Products, Council of Europe Expert Committee and Blood Transfusion Study Group on Pathogen Inactivation in Labile Blood Products, *Transfusion Medicine*, 2001, 11, 149-175).

40 Se sabe que el tratamiento térmico en seco es eficaz para la inactivación tanto de virus envueltos como de algunos no envueltos, mientras que el tratamiento con disolvente-detergente es conocido por ser eficaz para la inactivación de virus envueltos (es decir, recubiertos con lípidos) tales como el virus de la hepatitis B.

45 Se conocen en la técnica varios métodos para la purificación de fibrinógeno. Sin embargo, los métodos de purificación de la técnica anterior adolecen de varios inconvenientes. Por ejemplo, los métodos de precipitación no permiten la fácil incorporación de una etapa de inactivación de virus mediante disolvente-detergente (SD: Solvent-Detergent), ya que la eliminación de los reactivos de SD se lleva a cabo mucho más eficazmente mediante cromatografía. Los métodos de cromatografía pueden no separar el fibrinógeno del plasminógeno en una sola etapa, lo que puede conducir a la necesidad de una cromatografía adicional para adsorber el plasminógeno, o a la necesidad de añadir un agente antifibrinolítico al preparado final de fibrinógeno para combatir el plasminógeno residual. Además, no todos los métodos de la técnica anterior son adecuados para la purificación del fibrinógeno a partir de una amplia gama de soluciones que contienen fibrinógeno (incluyendo plasma y fracciones recombinantes).

55 La patente de EE.UU. nº 5.169.936 ha sugerido previamente que la cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC: immobilised metal ion affinity chromatography) podría usarse en la preparación de fibrinógeno humano. Sin embargo, no se describen ejemplos de tal método, ni hay ninguna sugerencia de que podría usarse la IMAC para la separación de fibrinógeno del plasminógeno.

60 La gama de cromatografía ProSep® de Millipore ofrece absorbentes desarrollados para la purificación de moléculas biológicas usando IMAC. Se ha anunciado que Prosep Chelating III es adecuado para la separación de moléculas grandes tales como fibrinógeno.

65 Se sabe también que la disolución de concentrados de fibrinógeno puede ser difícil, y que con frecuencia requiere el uso de temperaturas elevadas o una agitación prolongada (véanse la patente de EE.UU. nº 5.260.420 y el documento EP-A 0804933). Debido a la inestabilidad de las soluciones líquidas de fibrinógeno a lo largo del tiempo, los preparados de fibrinógeno para uso clínico se comercializan en forma de solución congelada a baja temperatura o bien como liofilizado (es decir, un preparado secado congelado). Antes de su uso, el producto comercial ha de ser descongelado o bien reconstituido a partir del liofilizado. Las dos medidas requieren un tiempo y un esfuerzo significativos.

Por tanto, sería conveniente proporcionar métodos alternativos para la purificación del fibrinógeno, en particular un método que sea aplicable a cualquier material de partida que contenga fibrinógeno y que permita la incorporación de una o más etapas de inactivación de virus. También sería ventajoso proporcionar un método para la separación de fibrinógeno del plasminógeno. Además, sería ventajoso proporcionar un concentrado de fibrinógeno liofilizado, y preferentemente tratado térmicamente, que pueda ser fácilmente redissuelto a temperatura ambiente.

En un aspecto, la presente invención proporciona por tanto un método para la separación y purificación de fibrinógeno y plasminógeno, que comprende las etapas de:

(a) cargar una solución que comprende fibrinógeno y plasminógeno en una matriz de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados, bajo unas condiciones tales que el fibrinógeno y el plasminógeno se unen ambos a la matriz, y

(b) eluir selectivamente el fibrinógeno y el plasminógeno separadamente de la matriz. El fibrinógeno y el plasminógeno pueden recogerse por separado y ser tratados cada uno de ellos según se requiera.

Preferentemente, la solución que comprende fibrinógeno es una fracción de plasma que contiene fibrinógeno.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la separación de fibrinógeno de plasminógeno, que comprende el uso de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados. Preferentemente, el método comprende las etapas de:

(a) cargar una solución que comprende fibrinógeno y plasminógeno en una matriz de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados, bajo unas condiciones tales que al menos el fibrinógeno se une a la matriz, y

(b) eluir selectivamente el fibrinógeno de la matriz. Preferentemente, el plasminógeno se une también a la matriz y el plasminógeno y el fibrinógeno pueden ser eluidos de la matriz selectivamente por separado.

Como se usa en el presente texto, las referencias a la separación y/o a la purificación de fibrinógeno incluyen la separación conjunta y/o la copurificación de fibrinógeno y factor XIII juntos a partir de materiales de partida que comprenden tanto fibrinógeno como factor XIII.

El material de partida para los métodos de la presente invención puede ser cualquier solución que contenga fibrinógeno, incluyendo plasma humano o animal, o una fracción del plasma, fracciones de cultivo de células de la tecnología recombinante, fracciones derivadas de leche de animales transgénicos, etc. Los materiales de partida preferidos son fracciones de plasma tales como crioprecipitado, precipitado de heparina y precipitado en frío. Los materiales de partida más preferidos incluyen precipitado de heparina y crioprecipitado. Otros materiales de partida preferidos incluyen aquellos que comprenden plasminógeno y/o factor XIII.

El material de partida puede prepararse por cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo el empleo de la manipulación de genes, por ejemplo en cultivo de células o especies transgénicas. Por ejemplo, puede prepararse el crioprecipitado de acuerdo con el método de Gunson H. H., Bidwell E., Lane R. S., Wensley R. T., Snape T. J., "Variables involved in crioprecipitate production and their effect on Factor VIII activity", British Journal of Haematology, 1978; 43: 287-295; el precipitado de heparina puede prepararse de acuerdo con el método de Winkelmann L., Owen N. E., Evans D. R., Evans H. E., Haddon M. E., Smith J. K., Prince P. J., Williams J. D., Lane R. S., "Severely heated therapeutic Factor VIII concentrate of high specific activity", Vox Sanguinis, 1989; 57: 97-103; y el precipitado en frío de acuerdo con el método de Smith J. K., Evans D. R., Stone V., Snape T. J., "A Factor VIII concentrate of intermediate purity and higher potency", Transfusion, 1979; 19: 299-306.

Los contaminantes no deseados en el material de partida, que pueden ser separados del fibrinógeno usando los métodos de la presente invención, pueden incluir otras proteínas (por ejemplo proteínas del plasma tales como el plasminógeno), reactivos de las etapas iniciales de tratamiento (por ejemplo elementos del medio de cultivo de células o reactivos de disolvente-detergente), virus y priones. Se prefiere de un modo particular eliminar el plasminógeno, de forma que puede evitarse la adición de inhibidores de plasmina (agentes antifibrinolíticos) al fibrinógeno.

La solución que contiene fibrinógeno se carga en una matriz de IMAC. Preferentemente, la matriz está presente en una columna para facilitar el proceso. Puede usarse cualquier ion metálico adecuado, por ejemplo cobre, zinc o níquel, preferentemente cobre. Los geles de cromatografía de afinidad por iones metálicos adecuados, que se pueden usar en el procedimiento de la presente invención, incluyen gel de metacrilato con ligandos multi-sustituídos en los espaciadores de cadena lateral (p. ej. Fractogel EMD Chelate de Merck), gel de metacrilato con grupos quelantes simples en el brazo espaciador (p. ej. Toyopearl Chelate de Tosoh Biosep) y gel de agarosa entrecruzada (p. ej., Sepharose Chelant FF de Amersham Biosciences). Un gel preferido es quelato Toyopearl AF 650(M) de Tosoh Biosep.

Las condiciones de carga, incluyendo el tampón usado, deben elegirse de forma que el fibrinógeno, y cualquier posible factor XIII si está presente, del material de partida se unan al gel. Los contaminantes no deseados que no se unen al gel pueden entonces ser eliminados por lavado. Por ejemplo, si el material de partida ha sido previamente sometido a una etapa de inactivación por disolvente y detergente, cualquier reactivo de disolvente o detergente que quede no se une al gel y se elimina fácilmente por lavado. Alternativamente, si los contaminantes no deseados se

unen al gel, pueden ser eliminados por elución selectiva antes de eluir el fibrinógeno, o pueden permanecer unidos al gel mientras el fibrinógeno se eluye selectivamente. Adicionalmente, el lavado del gel y de la proteína o las proteínas unidas puede contribuir también a eliminar cualquier virus que pueda estar presente en los materiales de cromatografía.

5 Se ha encontrado que el plasminógeno se une menos estrechamente que el fibrinógeno o el factor XIII a los geles de cromatografía de quelato metálico. El plasminógeno presente en el material de partida puede ser eliminado por tanto mediante lavado, mediante elución selectiva usando una solución de baja concentración de compuesto quelante competitivo de bajo peso molecular, o cambiando las condiciones para reducir la fuerza de unión, por ejemplo reduciendo el pH o la fuerza iónica, mientras el fibrinógeno permanece unido. Los compuestos quelantes adecuados
10 incluyen aminoácidos, por ejemplo alanina, leucina y lisina, imidazol, sales citrato y ácido etilendiaminatetraacético (EDTA). Un compuesto quelante preferido para la elución de plasminógeno es la alanina. La concentración del compuesto quelante debe elegirse de forma que el plasminógeno se eluye mientras el fibrinógeno permanece unido al gel. La concentración exacta dependerá del eluyente usado. Por ejemplo, concentraciones de aproximadamente < 20 mM deben eliminar selectivamente el plasminógeno en presencia de fibrinógeno unido. Las concentraciones
15 adecuadas para la elución del plasminógeno incluyen ≤ 20 mM de alanina o leucina, ≤ 10 mM de lisina y < 10 mM de imidazol.

El fibrinógeno puede entonces ser eluido usando una concentración más alta del mismo compuesto quelante o de otro distinto, o reduciendo el pH o la fuerza iónica. Los compuestos quelantes preferidos para la elución del fibrinógeno
20 son los aminoácidos, preferentemente lisina o arginina, y el imidazol. Un eluyente más preferido comprende arginina. Por ejemplo, el fibrinógeno puede ser eluido usando una solución > 20 mM del compuesto quelante. Las condiciones para la elución del fibrinógeno (concentración y pH) deben elegirse de forma que el fibrinógeno sea eliminado del gel pero que no lo sea el ion metálico, con el fin de minimizar la contaminación del producto con iones metálicos.

25 La eliminación del plasminógeno es ventajosa ya que el fibrinógeno puede entonces ser usado clínicamente sin necesidad de añadir ningún agente antifibrinolítico al preparado clínico. Otros aspecto ventajoso es que el plasminógeno que ha sido separado del fibrinógeno mediante IMAC puede entonces seguir siendo procesado para dar un concentrado de plasminógeno para uso clínico. La IMAC puede usarse por tanto para preparar tanto plasminógeno como fibrinógeno a partir de una solución de partida que comprende plasminógeno y fibrinógeno.

30 Un aspecto ventajoso del procedimiento de la presente invención es que cualquier posible factor XIII en el material de partida tiende a coeluir con el fibrinógeno. La presencia de una cantidad medible (> 1 u/ml) de factor XIII en los preparados finales de fibrinógeno puede ser beneficiosa si el fibrinógeno se va a usar clínicamente. Se ha demostrado que la concentración de factor XIII tiene efecto en algunas pruebas *in vitro* de sellantes de fibrina, aun cuando no
35 hay ninguna evidencia de que el factor XIII sea necesario para la eficacia clínica, y se han usado con efecto clínico productos sellantes de fibrina sin una actividad mensurable de factor XIII. Cuando se usa en un entorno sanguíneo (p. ej. para hemostasis), el factor XIII endógeno del paciente estará presente para efectuar el entrecruzamiento del coágulo. Si no es así, es posible que la presencia de factor XIII en el producto pudiera ser beneficiosa. Como el factor XIII es una enzima catalítica, puede operar efectivamente incluso a baja concentración.

40 Opcionalmente, el material de partida que contiene fibrinógeno puede ser sometido a un tratamiento de inactivación de virus por disolvente-detergente antes de la cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados. La inactivación de virus por disolvente y detergente puede llevarse a cabo usando reactivos y métodos conocidos en la técnica (véanse por ejemplo la patente de EE.UU. n° 4.481.189, la patente de EE.UU. n° 4.613.501 y la patente de
45 EE.UU. n° 4.540.573, todas las cuales se incorporan al presente texto como referencia). Los disolventes adecuados incluyen fosfato de tri-n-butilo (TnBP) y éter, preferentemente TnBP. Los detergentes adecuados incluyen polisorbato (Tween) 80, polisorbato (Tween) 20 y Triton X-100. Un detergente preferido es el polisorbato 20 y una combinación particularmente preferida es polisorbato 20 y TnBP.

50 La fracción que contiene fibrinógeno puede agitarse con reactivos de disolvente y detergente a una temperatura y durante un tiempo suficientes para inactivar cualquier posible virus envuelto que pueda estar presente. Por ejemplo, el tratamiento con disolvente y detergente puede llevarse a cabo durante aproximadamente 1 hora a 25°C.

55 El fibrinógeno recuperado de la etapa de cromatografía puede entonces seguir siendo procesado con el fin de formularlo para uso farmacéutico. Por ejemplo, puede ser concentrado mediante ultrafiltración hasta una concentración de aproximadamente 15 - 30 mg/ml, y/o ser sometido a una posterior etapa de reducción de agentes patógenos, por ejemplo una etapa de nanofiltración.

60 El concentrado puede entonces ser formulado mediante la adición de una combinación de estabilizantes adecuados, por ejemplo un aminoácido, un hidrato de carbono, una sal, y un detergente. De forma particularmente preferible, el producto se formula sin añadir ningún agente antifibrinolítico ni proteínas estabilizantes tales como albúmina. El producto formulado puede entonces ser esterilizado mediante filtración y liofilizado para un almacenamiento de larga duración. Opcionalmente, el producto liofilizado puede ser sometido a un tratamiento térmico en seco en otra etapa de inactivación de virus. Por ejemplo, puede ser calentado a aproximadamente 80°C durante aproximadamente 72 horas,
65 o a aproximadamente 100°C durante aproximadamente 24 horas.

La combinación del aminoácido, la sal, el hidrato de carbono y el detergente usada para formular el producto de fibrinógeno contribuye a estabilizarlo a través de la etapa de liofilización y tratamiento térmico terminal. También

ES 2 332 780 T3

facilita la reconstitución del producto liofilizado. En particular, los estabilizantes ayudan a estabilizar cualquier factor XIII presente en el producto, que como se sabe es muy lábil.

El producto liofilizado y tratado térmicamente puede ser reconstituido con agua a temperatura ambiente en menos de 15 minutos, preferentemente menos de 10 minutos, y lo más preferentemente menos de 5 minutos, para proporcionar una solución de fibrinógeno con una concentración de al menos aproximadamente 60 mg/ml.

Un aspecto ventajoso de la presente invención es que se elimina el plasminógeno, evitándose así la necesidad de añadir agentes antifibrinolíticos al preparado final de fibrinógeno.

El fibrinógeno preparado de acuerdo con uno de los métodos de la presente invención puede seguir siendo procesado para formar un preparado de fibrinógeno liofilizado, preferentemente tratado térmicamente, que comprende además un hidrato de carbono, un tampón, una sal, un aminoácido y un detergente, y opcionalmente factor XIII, siendo capaz el preparado de disolverse en agua a temperatura ambiente en menos de 15 minutos, preferentemente menos de 10 minutos y más preferentemente menos de 5 minutos, para dar una solución de fibrinógeno. Preferentemente la concentración de fibrinógeno en la solución final es al menos aproximadamente 60 mg/ml.

Sin el deseo de vincularse a ninguna teoría, se cree que la combinación de la sal, el detergente, el aminoácido y el hidrato de carbono facilita la disolución rápida del preparado. También se cree que el hidrato de carbono ayuda a preservar cualquier posible actividad del factor XIII presente. El tampón controla el pH de la formulación. El uso de una combinación de un hidrato de carbono, un tampón, una sal, un aminoácido y un detergente en el preparado también estabiliza al fibrinógeno, y cualquier factor XIII presente, sin necesidad de añadir ningún otro estabilizante, por ejemplo otras proteínas tales como la albúmina. Esto es una ventaja ya que la adición de otras proteínas puede ser una fuente de contaminación vírica o de otro tipo del producto. Los preparados de fibrinógeno de la presente invención están por tanto exentos de proteínas estabilizantes, en particular albúmina. Preferentemente, los preparados de fibrinógeno de la presente invención están también libres de agentes antifibrinolíticos.

Los aminoácidos adecuados incluyen arginina, los hidratos de carbono adecuados incluyen sacarosa, trehalosa y rafinosa, preferentemente sacarosa, los tampones adecuados incluyen sales citrato (p. ej. citrato sódico) y sales fosfato (p. ej. fosfato sódico), las sales adecuadas incluyen cloruro sódico y los detergentes adecuados incluyen polisorbato 20.

Preferentemente, el detergente usado en la formulación final es el mismo detergente que se usa para cualquier otra etapa anterior de inactivación de virus por disolvente detergente, el ingrediente aminoácido es el mismo que se usa para eluir el fibrinógeno de la columna de quelato metálico, y los componentes de sal y tampón son los mismos que se usan durante la purificación, evitándose así la necesidad de eliminar elementos traza de estos compuestos del producto. Es también deseable minimizar la exposición del producto a una diversidad de reactivos durante la elaboración, ya que cada reactivo que se usa es una fuente de posible contaminación o de modificación no deseada del producto. Así pues, es preferible que los ingredientes del producto final sean reactivos que ya hayan sido usados durante el proceso.

Las concentraciones adecuadas de los diversos componentes dependerán de la naturaleza exacta y de la fuente de fibrinógeno, y pueden determinarse usando experimentos de tanteo rutinarios. Los intervalos de concentración adecuados antes de la liofilización incluyen:

hidrato de carbono (preferentemente sacarosa): aproximadamente 0,5 - 2,5% p/p;

detergente (preferentemente polisorbato 20): aproximadamente 0,1 - 0,5% p/p;

sal (preferentemente cloruro sódico): aproximadamente 50 - 250 mM, preferentemente aproximadamente 50 mM;

aminoácido (preferentemente arginina): aproximadamente 50 - 120 mM, preferentemente aproximadamente 110 mM.

Se añade tampón suficiente para controlar el pH según se desee, por ejemplo en un pH de aproximadamente 7,5.

Las formulaciones preferidas comprenden aproximadamente 0,5 - 2,5% p/p de sacarosa, aproximadamente 0,1 - 0,5% p/p de polisorbato 20, aproximadamente 50 - 250 mM, más preferentemente aproximadamente 50 mM, de cloruro sódico, y aproximadamente 50 - 120 mM de arginina a aproximadamente pH 7,5.

Los preparados de fibrinógeno de la presente invención se elaboran formando una solución de los componentes y después liofilizando la solución. Después de la liofilización, el preparado seco se somete preferentemente a una etapa final de tratamiento térmico con el fin de inactivar los virus envueltos y no envueltos. Por ejemplo, puede calentarse a aproximadamente 80°C durante aproximadamente 72 horas, o a aproximadamente 100°C durante aproximadamente 24 horas. Se sabe que el tratamiento térmico puede desnaturalizar las proteínas, lo que puede causar agregación y reducir la solubilidad de producto tratado térmicamente. Los otros ingredientes de los preparados ayudan a estabilizar el fibrinógeno, y cualquier posible factor XIII presente, durante la etapa de tratamiento térmico.

ES 2 332 780 T3

A continuación se da una descripción más detallada de las realizaciones preferidas de la presente invención:

Recuperación del crioprecipitado del plasma

5

El plasma humano congelado puede ser acondicionado a aproximadamente -11°C, descongelado a una temperatura entre -0,5 y 2°C, y el crioprecipitado resultante puede ser recuperado mediante centrifugación. El crioprecipitado puede lavarse a < 4°C y recuperarse mediante centrifugación. El crioprecipitado puede almacenarse congelado.

10

Precipitación

15

El crioprecipitado puede ser descongelado con tampón (esto es, redissuelto) para recuperar las proteínas contenidas en el mismo. El fibrinógeno, la fibronectina y el factor XIII pueden entonces ser precipitados usando un agente químico adecuado, por ejemplo heparina, polietilenglicol (PEG) o etanol, o ajustando la temperatura y el pH. Después se recupera el precipitado, por ejemplo mediante centrifugación. Este precipitado puede ser almacenado congelado.

20

Resuspensión del precipitado

25

El precipitado de heparina o cualquier otro precipitado puede entonces ser resuspendido usando un tampón apropiado y agitando durante un tiempo suficiente y a una temperatura adecuada. El preparado resultante puede entonces ser clarificado, por ejemplo mediante filtración profunda o centrifugación, antes de la filtración por 0,45 µm o menos, para eliminar cualquier agregado que pueda estar presente y que podría proteger a los virus frente a los reactivos de inactivación por disolvente-detergente.

Tratamiento con disolvente y detergente

30

Entonces puede añadirse disolvente y detergente al filtrado, y la mezcla se agita a una temperatura adecuada para inactivar los virus envueltos. El disolvente es preferentemente fosfato de tri-n-butilo (TnBP), mientras que el detergente puede ser polisorbato 20, polisorbato 80 o Triton X-100, preferentemente polisorbato 20.

35

Cromatografía

40

El material tratado con disolvente y detergente puede entonces ser aplicado directamente a una columna de cromatografía de quelato metálico, en la que el ion metálico puede ser cobre o cualquier otro ion adecuado. Las condiciones del tampón y de la carga son tales que los componentes de disolvente y detergente no son retenidos por el adsorbente mientras que el fibrinógeno sí lo es. Cualquier plasminógeno que esté unido puede entonces ser eluido selectivamente usando una baja concentración de un compuesto quelante de bajo peso molecular, por ejemplo alanina. La fracción de lavado del eluido que contiene el plasminógeno puede entonces seguir siendo procesada para dar un concentrado de plasminógeno, que puede ser usado clínicamente. Entonces el fibrinógeno puede ser eluido con alto rendimiento usando una concentración más alta del mismo compuesto quelante, u otro, por ejemplo arginina. El factor XIII es coeluido con el fibrinógeno. El fibrinógeno está generalmente presente en el eluido a concentraciones de aproximadamente 3 - 20 mg/ml.

50

La elución de la columna puede ser monitorizada por cualquier método adecuado, por ejemplo por absorbancia de UV a una longitud de onda de 280 nanómetros. Esto da una medida de la concentración de proteína en el eluido, y puede usarse para el rastreo de la recogida de las fracciones y/o cambios de tampón.

Concentración

55

Opcionalmente, el eluido de fibrinógeno puede ser concentrado usando ultrafiltración, para dar concentraciones finales de aproximadamente 15 - 30 mg/ml, preferentemente aproximadamente 20 - 25 mg/ml.

Formulación

60

65

El concentrado de fibrinógeno puede ser formulado mediante la adición de una combinación de un aminoácido, un hidrato de carbono, un tampón, una sal y un detergente. El producto formulado puede entonces esterilizarse mediante filtración por 0,2 µm y envasarse. Tal filtración puede eliminar o reducir los virus u otros agentes patógenos, por ejemplo el agente causante de encefalopatías espongiformes transmisibles (Transmissible Spongiform Encephalopathies: TSE), que actualmente se cree que es un prión. El tampón de formulación (y las condiciones de la liofilización) se eligen preferentemente de forma que el tapón de fibrinógeno pueda ser reconstituido en agua a temperatura ambiente en menos de 10 minutos. Una formulación preferida es arginina 110 mM, 1,5% p/p de sacarosa, 0,1% p/p de polisorbato 20, NaCl 50 mM, citrato trisódico 10 mM.

Liofilización y tratamiento térmico

El producto se liofiliza y después opcionalmente se somete a tratamiento térmico a temperaturas elevadas con el fin de inactivar los virus envueltos y no envueltos.

La contaminación microbiológica durante el proceso se reduce al mínimo mediante la adecuada higienización del medio de IMAC y por filtración de los tampones para eliminar la contaminación bacteriana (p. ej. usando filtros de 0,2 μm).

El fibrinógeno preparado usando el procedimiento de la presente invención puede ser usado clínicamente, bien sea solo o en combinación con trombina en un *kit* sellante de fibrina. La presente invención proporciona también fibrinógeno obtenido de acuerdo con el procedimiento de la invención, para su uso en terapia, y *kits* farmacéuticos que comprenden fibrinógeno obtenido de acuerdo con el procedimiento de la presente invención en combinación con trombina. Se prefieren los *kits* que comprenden fibrinógeno preparado de acuerdo con el procedimiento de la invención y trombina preparada de acuerdo con la solicitud PCT de los solicitantes, pendiente en común con la presente n° (desconocido), que lleva el título "Process for the preparation of thrombin" presentada el 7 Julio de 2003 que reivindica la prioridad de la solicitud de patente de GB No. 0216002.6 presentada el 10 de Julio de 2002, cuya descripción se incorpora al presente texto como referencia.

La invención se ilustrará con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

El fibrinógeno se midió usando los métodos siguientes: Ensayo de Precipitación Térmica basado en un método publicado por Desvignes, P. y Bonnet, P., "Direct Determination of Plasma Fibrinogen levels by Heat Precipitation. A comparison of the Technique against Thrombin Clottable Fibrinogen with Spectrophotometry and Radial Immune Diffusion", *Clinica Chimica Acta*, 110 (1981), 9-17. Ensayo del Tiempo de Coagulación basado en el método de Clauss (Clauss, A., *Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens*. *Acta Haematol* 1957; 17: 234-46). Ensayo Coagulable Total (Total Clottable Assay) basado en un método de Blomback y Blomback, *Arkiv fur Chemi.*, 1956, Capítulo 10, 415-443.

El factor XIII se midió por determinación fotométrica (plasma humano estándar - normal). El método estaba basado en las siguientes referencias:

Fickenscher, K., Aab, A., Stuber, W., "A Photometric Assay for Blood Coagulation Factor XIII", *Thromb. Haemostas.* 65 (1991), 535-540 y **Solleder, E., Demuth, D., Pfeiffer, C., Bomhard, M., Mayer, J., Eller, T., Brauer, P., Keller, F., Grun, J., Fickenscher, K., Wagner, C.**, "Klinische Prüfung eines neuen photometrischen Tests zur Bestimmung der Factor XIII Aktivität im Plasma", *Lab Med.* 16 (1992), 48-53.

El plasminógeno y el factor XIII fueron medidos mediante ELISA.

Ejemplo 1

Recuperación del crioprecipitado del plasma

El plasma fue almacenado a una temperatura por debajo de -30°C hasta su uso. Después el peso de plasma requerido se acondicionó a -11°C antes de desmontar el envase. La agrupación de plasma se descongeló después a una temperatura por debajo de 2,5°C con el fin de recuperar el crioprecipitado de fibrinógeno, factor VIII, factor de von Willebrand (vWF) y fibronectina del plasma. Este precipitado se recuperó mediante centrifugación y se almacenó congelado.

Ejemplo 2

Precipitación

El crioprecipitado preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 fue resuspendido en Tris/HCl 20 mM pH 6,7 a razón de 0,024 veces el peso neto de la agrupación de plasma, y se descongeló calentando a una temperatura entre 20 y 40°C durante más de 20 minutos. Después se ajustó el pH en 6,55 con HCl 0,1 M. Después se añadió una solución madre de heparina para dar una concentración final de 0,88 mg/ml y la mezcla resultante se agitó durante más de 2 minutos. Esto tuvo por resultado la precipitación de fibrinógeno y fibronectina dejando el factor VIII y el vWF en solución. El precipitado de heparina se recuperó después mediante centrifugación. Este precipitado puede ser almacenado congelado.

ES 2 332 780 T3

Ejemplo 3

Resuspension del precipitado

5 El precipitado de heparina preparado de acuerdo con el Ejemplo 2 se resuspendió en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 20 mM, citrato trisódico 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 6,0 en una relación de 1 parte de precipitado por 5 partes de tampón. Esta suspensión se calentó después a 40°C y se incubó con agitación durante más de 1 hora. El precipitado de heparina resuspendido se clarificó después mediante filtración a través de dos filtros de profundidad (Cuno 05SP y Cuno 30LA) y un filtro de membrana (Sartobran 0,65/0,45 μm) para asegurar la eliminación de agregados que podrían proteger a los virus del subsiguiente tratamiento con disolvente detergente.

Ejemplo 4

Tratamiento con disolvente detergente

Una solución madre de disolvente detergente 20% v/v de polisorbato 20 y 6% v/v de TnBP se añadió después al filtrado para dar una concentración final de 1% v/v de polisorbato 20 y 0,3% v/v de TnBP. La mezcla resultante se agitó después durante no menos de 1 hora a temperatura ambiente.

Ejemplo 5

Cromatografía

25 El precipitado de heparina tratado con disolvente y detergente preparado de acuerdo con el Ejemplo 4 se cargó en una columna de quelato 650(M) cargada con cobre Toyopearl AF que había sido preequilibrada con no menos de 5 volúmenes del lecho de tampón 1 (EW1: $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 20 mM, citrato trisódico 10 mM, NaCl 0,5 M pH 6,0). La columna se cargó después con 3 volúmenes de lecho de precipitado de heparina tratado. La velocidad de carga no fue superior a 77 cm/hr. El lecho se lavó después con 18 volúmenes de lecho de tampón 1. El plasminógeno unido se retiró por lavado usando 15 volúmenes de lecho de tampón 2 (EW2: Na_2HPO_4 20 mM, alanina 15 mM, NaCl 0,5 M pH 7,5). El plasminógeno eluido puede seguir siendo procesado para dar un concentrado que puede ser usado clínicamente. Las condiciones del tampón se ajustaron usando 5 volúmenes de lecho de tampón 3 (EW3: citrato trisódico 10 mM, NaCl 50 mM pH 7,0). El fibrinógeno unido se eluyó después usando suficientes volúmenes de lecho de tampón 4 (EW4: arginina 50 mM, citrato trisódico 10 mM, NaCl 50 mM pH 7,5) de forma que el valor de la A280 nm (absorbancia de UV a una longitud de onda de 280 nm) volvió a la línea base. Los iones de cobre se retiraron de la resina usando 5 volúmenes de lecho de Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 0,25 M, EDTA 50 mM pH 7,0.

Ejemplo 6

Concentración

45 El fibrinógeno eluido preparado de acuerdo con Ejemplo 5 se concentró usando una membrana con un corte de 100 kDa de peso molecular (Sartocon Sartorius). La membrana fue prelavada usando arginina 50 mM, citrato trisódico 10 mM, NaCl 50 mM pH 7,5. La concentración objetivo de fibrinógeno fue 22 mg/ml.

Ejemplo 7

Formulación

55 La solución concentrada de fibrinógeno preparada de acuerdo con el Ejemplo 6, fue formulada mediante la adición de arginina 710 mM, 16,5% p/p de sacarosa, 1,1% p/p de polisorbato 20, 50 mM NaCl, 10 mM citrato trisódico pH 7,5 a una relación de 1:10. Las concentraciones finales de la formulación fueron arginina 110 mM, 1,5% p/p de sacarosa, 0,1% p/p de polisorbato 20, NaCl 50 mM, citrato trisódico 10 mM. El producto formulado se filtró después en 0,2 μm (Sartobran 0,45/0,2 μm , Sartorius).

Ejemplo 8

Liofilización y tratamiento térmico

65 El producto del Ejemplo 7 se envasó asépticamente en viales de vidrio a razón de 15 ml por vial y luego se liofilizó, se tapó y se selló. Los viales se trataron térmicamente a 80°C durante un tiempo no inferior a 72 horas, con el fin de inactivar los virus no envueltos y envueltos.

ES 2 332 780 T3

Ejemplo 9

Cromatografía a escala piloto del concentrado de fibrinógeno

Se resuspendieron 1274 g precipitado de heparina (preparado de acuerdo con el Ejemplo 2) en 5 veces su volumen de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 20 mM, citrato trisódico 10 mM, NaCl 0,5 M pH 6,0 a 40°C en un baño de agua con agitación constante durante más de 1 hora. La solución resultante se filtró por 0,45 μm con el tren de filtración Cuno OSSP, Cuno 30LA y Sartobran P 0,65/0,45 μm . La mezcla de disolvente y detergente se añadió después para dar las concentraciones finales de 1% v/v de polisorbato 20 y 0,3% v/v de TnBP. Después se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora.

Se cargaron 6391 g de precipitado de heparina tratado con disolvente y detergente en 2123 mL de resina Toyopearl AF Chelate 650(M) empaquetada en una columna Amicon Vantage 130 para dar una altura una vez sedimentada de 16 cm. La columna de cromatografía fue higienizada usando 5 volúmenes de lecho de NaOH 0,5 M, y se equilibró con aproximadamente 5 volúmenes de lecho de tampón 1 (EW1, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 20 mM, citrato trisódico 10 mM, NaCl 0,5 M pH 6,0). Esto se lavó intensamente con aproximadamente 5 volúmenes de lecho de agua destilada. La resina se cargó después con iones metálicos usando aproximadamente 5 volúmenes de lecho de una solución de 3 mg/ml de sulfato de cobre. Los iones metálicos unidos ligeramente se eliminaron usando aproximadamente 5 volúmenes de lecho de arginina 50 mM, citrato trisódico 10 mM, NaCl 50 mM pH 7,5, y después aproximadamente 10 volúmenes de lecho de tampón 1. Después se aplicó la carga, y el lecho se lavó después con aproximadamente 18 volúmenes de lecho de tampón 1. El plasminógeno unido se eliminó por lavado usando aproximadamente 16 volúmenes de lecho de tampón 2 (EW2: $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 20 mM, alanina 15 mM, NaCl 0,5 M pH 7,5). Las condiciones del tampón se ajustaron después usando aproximadamente 5 volúmenes de lecho de tampón 3 (EW3: citrato trisódico 10 mM, NaCl 50 mM pH 7,0). El fibrinógeno unido se eluyó entonces usando aproximadamente 5 volúmenes de lecho de tampón 4 (EW4: arginina 50 mM, citrato trisódico 10 mM, NaCl 50 mM pH 7,5). Los iones cobre se eliminaron después de la resina usando aproximadamente 5 volúmenes de lecho de Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 0,25 M, EDTA 50 mM pH 7,0.

Las concentraciones y los datos de recuperación para fibrinógeno, plasminógeno y Factor XIII se dan en la Tabla 1. El aclaramiento de TnBP y polisorbato 20 se dan en la Tabla 2.

TABLA 1

Muestra	Volumen ml	Fibrinógeno		Factor XIII		Plasminógeno	
		mg/ml	%	U/ml	%	mg/ml	%
Carga	6391	11,81	(100)	0,8	(100)	43,9	(100)
FT	6407	< 1	< 8,49			0,01	0,02
EW1	31971	< 1	< 42,36	0,01	6,25	0,03	0,34
EW2	33800	< 1	< 44,78	0,05	33,06	7,74	93,25
EW3	10674	< 1	< 14,14	0,05	10,44	0,20	0,76
EP1	680						
EP2	8943	6,45	76,43	0,32	55,98	4,00	12,75
EP3	2060						
EDTA	9155	< 1	< 12,13			0,01	0,03

Abreviaturas usadas: FT = caudal; EW1 = lavado de equilibrado 1; EW2 = lavado de equilibrado 2; EW3 = lavado de equilibrado 3; EP1 = pico de elución 1 (borde delantero del pico de elución); EP2 = pico de elución 2 (pico de elución principal); EP3 = pico de elución 3 (borde trasero del pico de elución).

TABLA 2

Muestra	Volumen (ml)	TnBP		Polisorbato 20	
		Conc. (mg/ml)	Recupera- ción (%)	Conc. (mg/ml)	Recupera- ción (%)
Carga	6391	2900	(100)	13700	(100)
EP2	8943	6,9	0,3	38	0,4

Abreviaturas usadas: EP2 = pico de elución 2 (pico de elución principal)

ES 2 332 780 T3

Los resultados indicaron que las tres proteínas, fibrinógeno, plasminógeno y factor XIII, eran capturadas eficazmente sobre el Toyopearl cargado con Cu^{2+} y después el 93% del plasminógeno cargado era eliminado selectivamente mediante lavado con el tampón de alanina 15 mM (EW2). El producto de fibrinógeno eluido contenía el 76% y 56% del fibrinógeno y del factor XIII aplicados respectivamente. El aclaramiento de los productos químicos de disolvente y detergente fue también eficiente: solamente el 0,3 y el 0,4% del TNBP y del polisorbato 20 aplicados, respectivamente, se quedaron en el producto después de la cromatografía.

Ejemplo 10

Ultrafiltración del fibrinógeno a escala piloto

Se montaron dos cassettes slice de polisulfona Sartorius (0,1 m² cada una) en un portamembranas Sartorius, y se lavaron con 7 l de agua desionizada. El conjunto se higienizó con un lavado de 1 L de NaOH 1 M calentada a 40°C y después 5 L de NaOH, recirculado durante 1 hora. Después se lavó el sistema con 10 L de agua desionizada a una velocidad de flujo transversal de 880 ml/min. La membrana se preparó con 5 L de EW4 (arginina 50 mM, citrato trisódico 10 mM, NaCl 50 mM pH 7,5) sin aplicar contrapresión a la misma velocidad de flujo transversal.

Se aplicaron 8960 ml de fracción eluida de fibrinógeno a una concentración inicial de fibrinógeno de 5,24 mg/ml a una presión de entrada máxima y una presión transmembrana de 1,4 y 0,7 bares (140.000 y 70.000 Pa) respectivamente. La ultrafiltración llevó 1 hora y 36 minutos y dio un retentado de 1227 ml y 23,8 mg/ml de fibrinógeno. El flujo medio fue 28,8 L/m²/h y las concentraciones de gelificación previstas fueron 31,0 mg/ml.

Ejemplo 11

Elección de los geles de IMAC para la purificación del fibrinógeno

Varios geles de cromatografía de quelato metálico fueron ensayados en relación con su capacidad para unir y subsiguientemente liberar fibrinógeno. Estos se describen en la Tabla 3 que sigue:

TABLA 3

Gel	Fabricante	Matriz de base	Grupo quelante
Toyopearl Chelate AF	Tosoh Biosep	Metacrilato	ácido iminodiacético
Toyopearl Chelate AF brazo espaciador modificado	Tosoh Biosep	Metacrilato	ácido iminodiacético
Fractogel EMD Chelate	Merck	Metacrilato	ácido iminodiacético
Sepharose quelante FF	Amersham Biosciences	Agarosa entrecruzada	ácido iminodiacético

El material de partida era un crioprecipitado que contenía fibrinógeno. Este precipitado fue redisoluto en tampón I (tampón de fosfato sódico 20 mM que contiene cloruro sódico 250 mM o bien cloruro sódico 500 mM, pH 7). El gel quelante fue cargado con iones metálicos (cobre, níquel o zinc) y luego se equilibró con Tampón I. El crioprecipitado redisoluto se aplicó a una columna empaquetada que contenía el gel cargado equilibrado. Una vez aplicado todo el material, la columna fue lavada con Tampón I. El fibrinógeno fue eluido lavando la columna con Tampón II (fosfato sódico 20 mM, tampón de EDTA 0,05 M que contiene cloruro sódico 250 mM o bien cloruro sódico 500 mM, pH 7) o Tampón III (fosfato sódico 20 mM, arginina 50 mM, cloruro sódico 250 mM, pH 7,5) o Tampón IV (fosfato sódico 20 mM, arginina 200 mM, cloruro sódico 250 mM pH 7,0).

Los resultados se muestran en la Tabla 4.

ES 2 332 780 T3

TABLA 4

Gel	Ion metálico	Fibrinógeno eluido, mg por ml de gel	Factor XIII eluido, µg por mg de fibrinógeno
Toyopearl Chelate AF (Tosoh Biosep)	cobre	38,7 ^a	0,3
Toyopearl Chelate AF (Tosoh Biosep)	cobre	24,1 ^b	0,1
Toyopearl Chelate AF (brazo espaciador modificado) (Tosoh Biosep)	cobre	35,6 ^b	0,08
Fractogel EMD Chelate (Merck)	cobre	30,8 ^a	0,26
Sepharose quelante FF (Amersham Biosciences)	cobre	16,1 ^a	No ensayado
Toyopearl Chelate AF (Tosoh Biosep)	zinc	23,5 ^a	0,22
Fractogel EMD Chelate (Merck)	zinc	31 ^a	0,27
Sepharose quelante FF (Amersham Biosciences)	zinc	11,5 ^a	No ensayado
Toyopearl Chelate AF (Tosoh Biosep)	níquel	23,7 ^c	No ensayado

^a Eluido con Tampón II.

^b Eluido con Tampón III.

^c Eluido con Tampón IV.

Los resultados indican que el fibrinógeno y el factor XIII pueden ser aislados de una solución que contiene fibrinógeno usando cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) con una diversidad de características químicas de la matriz de base y de iones metálicos.

Ejemplo 12

Elección de los materiales de partida

La capacidad de la cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) para purificar el fibrinógeno de diferentes soluciones que contienen fibrinógeno ha sido investigada.

Soluciones que contienen fibrinógeno

- Crioprecipitado redisuelto obtenido de plasma humano descongelado (preparado de acuerdo con el Ejemplo 1).
- Precipitado de heparina redisuelto obtenido de crioprecipitado redisuelto que había sido mezclado con heparina (preparado de acuerdo con el Ejemplo 2).
- Precipitado en frío redisuelto obtenido por enfriamiento rápido de crioprecipitado redisuelto.
- Solución que contiene fibrinógeno empobrecida cromatográficamente en factor VIII, factor de von Willebrand (vWF) y fibronectina, obtenida a partir de plasma humano.

ES 2 332 780 T3

El precipitado en frío usado en C fue preparado de la forma siguiente: el crioprecipitado, preparado como en el Ejemplo 1, fue redissuelto en cuatro veces su peso de solución de cloruro cálcico 50 μ M a 28°C. El pH se ajustó en 6,8 con ácido acético 1 M y la solución se enfrió a 10°C. Después de agitar durante más de 10 minutos, el precipitado que se formó se recogió mediante centrifugación.

Cada solución A-D, conteniendo aproximadamente 1 a 20 mg de fibrinógeno por ml, fue incubada con disolvente y detergente para inactivar los virus, después se aplicó a una columna de resina para IMAC Toyopearl Chelate que había sido cargada con iones cobre y equilibrada con fosfato sódico 20 mM, cloruro sódico 250 mM pH 7,0. Después de cargar, la resina se lavó con el mismo tampón. El fibrinógeno fue eluido mediante la aplicación de imidazol 25 mM (Tampón X) o arginina, 50 mM fosfato sódico 20 mM, cloruro sódico 250 mM pH 7,5 (Tampón Y).

Los resultados se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

Material de partida	Fibrinógeno en el material de partida	Tampón de elución	Fibrinógeno en el eluido, mg por ml de resina
A: crioprecipitado	14,1	X	29,8
C: precipitado en frío	21,6	X	29,0
D: solución de fibrinógeno	0,73	X	38,7
A: crioprecipitado	11,1	Y	32,5
B: precipitado de heparina	14,8	Y	29,9
C: precipitado en frío	20,9	Y	31,4

Los resultados indican que la IMAC puede ser usada para preparar fibrinógeno a partir de distintos materiales de partida que contienen fibrinógeno.

Ejemplo 13

Formulación de fibrinógeno para permitir la redisolución rápida después de la liofilización y el tratamiento térmico

El fibrinógeno que había sido eluido de la resina de IMAC de acuerdo con los Ejemplos 9 y 10, y concentrado hasta aproximadamente 15 mg/ml en arginina 50 mM, fosfato 20 mM pH 7,5 (Tablas 6 y 8) o arginina 50 mM, citrato trisódico 10 mM pH 7,5 (Tabla 7), fue formulado con diversos compuestos añadidos, introducido en viales de vidrio (20 ml por vial) y liofilizado. Al final de la liofilización, los viales se sellaron bajo vacío, y después de trataron térmicamente a 80°C durante 72 horas para inactivar los virus. Los viales fueron después reconstituidos con agua (5 ml por vial) a temperatura ambiente (18°C a 25°C). El tiempo de redisolución se midió como el tiempo entre la adición de agua y el tiempo para el cual se observó una solución homogénea clara sin materia sólida residual.

Los resultados se muestran en las Tablas 6, 7 y 8.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 332 780 T3

TABLA 6

Arg. mM	Polis %	NaCl mM	Cit mM	Sac %	Tiempo de recons., min.	Fibr. des- pués de recons., mg/ml	Factor XIII después de recons., u/ml
50	0,5	250	10	1,5	4,5	44,3	< 1
50	0,1	250	10	1,5	8,1	49,3	< 1
50	0,5	250	0	0	4,1	40,0	< 0,5
50	0,5	250	10	1,5	6,5	37,0	< 0,5
50	0,5	250	0	1,5	5,8	33,1	< 0,5
50	0,25	250	0	1,5	4,9	35,4	< 0,5
50	0,1	250	0	1,5	3,9	39,9	< 0,5
50	0,5	230	0	1,5	4,5	36,6	< 0,5
50	0,5	200	0	1,5	3,6	37,5	< 0,5
50	0,5	180	0	1,5	4,9	35,0	< 0,5
50	0,5	150	0	1,5	4,2	37,9	< 0,5
50	0,5	130	0	1,5	5,7	36,8	< 0,5
50	0,5	100	0	1,5	7,1	36,9	< 0,5
50	0,5	80	0	1,5	7,8	36,9	< 0,5
50	0,5	50	0	1,5	12,2	41,3	1,2
50	0,5	50	10	1,5	8,6	43,3	1,3
50	0,5	50	0	2,5	7,6	40,7	1,2

TABLA 7

Arg. mM	Polis %	NaCl mM	Fos mM	Sac %	Tiempo de recons., min.	Fibr. des- pués de recons., mg/ml	Factor XIII después de recons., u/ml
50	0,5	250			6,3	63,7	< 1,5
50	0,5	50		1,5	4,5	67	2,4
50	0,5	50	20	1,5	2,1	63	1,9
50	0,25	50		1,5	1,4	71,7	1,8
50	0,1	50		1,5	1,6	61,9	1,8
50	0,25	50	20	1,5	2,0	62,1	1,8
50	0,1	50	20	1,5	2,6	70,8	1,7
50	0,5	50		1	4,3	70,1	2,0
50	0,5	50		0,75	2,7	69,1	2,0
50	0,5	50		0,5	2,6	73,3	1,7
50	0,25	50		0,75	3,0	71,7	1,8
100	0,1	50		1,5	8,8	54,8	1,3
50	0,1	250			7,2	53,7	< 1
120	0,1	50		1,5	5,7	55,4	< 1

TABLA 8

Arg. mM	Poli %	NaCl mM	Cit mM	Carbo %	Tiempo de recons., min.	Fibr. des- pués de re- cons., mg/ml	Factor XIII después de recons., μ/ml
50	0,5	50	0	Sacarosa 1,5%	12,2	41,3	1,2
50	0,5	50	0	Trehalosa 1,5%	14,5	41,1	1,2
50	0,5	50	0	Rafinosa 1,5%	13,9	42,5	1,3

Abreviaturas usadas en las Tablas 6 a 8:

Arg = arginina

Poli = polisorbato 20

Cit = citrato

Sac = sacarosa

Fib = fibrinógeno

Recons = reconstitución

Carbo = hidrato de carbono

Fos = fosfato

Los resultados indicaron que los márgenes de concentración efectivos de los formulantes eran:

Sacarosa: 0,5 - 2,5 %

Polisorbato 20: 0,1 - 0,5%

Cloruro sódico: 50 a 250 mM (50 mM para retención de factor XIII)

Arginina: 50 - 120 mM

Las elevadas concentraciones de cloruro sódico (250 mM) en combinación con la arginina, el polisorbato 20 y una sal tampón permitieron la rápida reconstitución del fibrinógeno liofilizado tratado térmicamente, pero se perdió la actividad del factor XIII. La reducción del contenido de cloruro sódico acompañada por la adición de sacarosa permitió tanto la reconstitución rápida como la retención de la actividad del factor XIII.

Las combinaciones selectivas de arginina, polisorbato 20, cloruro sódico, una sal de tamponamiento adecuada y un hidrato de carbono, proporcionaron una formulación para fibrinógeno y factor XIII que permitió la reconstitución rápida a temperatura ambiente del producto liofilizado y tratado térmicamente, con retención de la actividad de fibrinógeno y del factor XIII.

Ejemplo 14

Ultrafiltración, formulación, liofilización y tratamiento térmico

En cuatro experimentos independientes (A a D), un precipitado de heparina fue resuspendido de acuerdo con el Ejemplo 3 y se trató con disolvente y detergente de acuerdo con el Ejemplo 4. La solución resultante se separó mediante cromatografía de acuerdo con el Ejemplo 9 para dar un eluido rico en fibrinógeno y factor XIII. Este eluido se concentró después de acuerdo con el Ejemplo 10. El concentrado fue formulado hasta un objetivo de arginina 110 mM, 1,5% p/p de sacarosa, 0,1% p/p de polisorbato 20, NaCl 50 mM, citrato trisódico 10 mM, y sometido a filtración esterilizante a 0,2 μm de acuerdo con el Ejemplo 7. El concentrado filtrado se envasó después asépticamente, se liofilizó y se sometió a tratamiento térmico de acuerdo con el Ejemplo 8 para dar un producto doble inactivado víricamente. Los materiales eluidos, los concentrados filtrados y los productos fueron ensayados en relación con la proteína coagulable y la actividad de factor XIII, y los resultados se muestran en la Tabla 9.

ES 2 332 780 T3

TABLA 9

Fracción	Propiedad	A	B	C	D
Material eluido	Proteína coagulable (mg/mL)	5,8	5,6	4,4	4,52
	Actividad de factor XIII (U/mL)	0,19	0,41	0,18	0,18
Concentrado filtrado	Proteína coagulable (mg/mL)	21,2	20,4	22,1	18,2
	Actividad de factor XIII (U/mL)	0,61	1,43	0,68	0,65
Producto	Proteína coagulable (mg/mL)	63,3	45,9	48,8	46,3
	Actividad de factor XIII (U/mL)	1,19	1,64	1,25	1,17
	Tiempo de reconstitución (min)	9,05	5,35	8,72	11,22

Los resultados indican que el fibrinógeno puede ser concentrado a aproximadamente 20 mg/mL usando ultrafiltración. También indican que las condiciones de formulación dan un producto con una concentración de factor XIII superior a 1 U/mL y tiempos de reconstitución muchos menores que 15 min.

Ejemplo 15

El efecto de la concentración del tampón de elución y el pH sobre la elución de fibrinógeno y cobre a partir de una resina de quelato

Se redisolvió el crioprecipitado en tampón 1 (tampón de fosfato 20 mM que contiene NaCl 0,25 M pH 6,0) y se trató con disolvente y detergente como en el Ejemplo 4. Se cargó resina de quelato (Toyopearl AF Chelate 650 (M)) con iones cobre, se sometió a un prelavado con el tampón de elución apropiado y después se equilibró con tampón 1. Este material se cargó en la resina cargada con cobre empaquetada. Una vez aplicado todo el material, la columna se lavó con quince a veinte volúmenes de tampón 1. Después la columna se lavó con cinco a siete volúmenes de lecho de tampón 2 (tampón de fosfato 20 mM que contiene NaCl 0,25 M pH 7,0). La columna fue eluida con un tampón que contiene fosfato 20 mM, NaCl 0,25 M y arginina en un margen de concentraciones y de pH.

Los resultados se muestran en la Tabla 10.

TABLA 10

Concentración de arginina en el tampón de elución	pH del tampón de elución	Concentración de fibrinógeno eluido	mg de fibrinógeno eluido por ml de resina	Concentración de cobre eluido mg/mL	µg de cobre por mg de fibrinógeno eluido
200	7	4,5	32,3	8	1,8
100	7	4,8	35,7	4,6	0,95
50	7	2,5	17,5	2	0,8
50	6,0	1,9	17,6	1,4	0,74
50	7,5	4,4	33,3	2	0,46
50	8,5	3,96	35,3	2,5	0,63

Los resultados indicaron que una reducción en la concentración de arginina en el tampón de elución redujo la concentración de cobre en el material eluido de fibrinógeno, pero tenía un efecto adverso sobre la recuperación del fibrinógeno. Un aumento del pH del tampón de elución de arginina 50 mM a 7,5 tuvo por resultado una elevada recuperación de fibrinógeno y los niveles de cobre co-eluido se redujeron sustancialmente.

ES 2 332 780 T3

Ejemplo 16

Tratamiento del precipitado de heparina

- 5 El precipitado de heparina congelado se redisolvió en fosfato sódico 20 mM, cloruro sódico 500 mM, citrato trisódico 10 mM pH 6,0, en una relación de 1:5 en peso. Se compararon dos métodos de redisolución:

Método 1. El precipitado de heparina se añadió al tampón a temperatura ambiente. Después se calentó la mezcla a 40°C y se incubó a 40°C durante 1 hora.

10 Método 2. El tampón se precalentó a 40°C y después se añadió el precipitado de heparina a una velocidad tal que permite que se mantenga a una temperatura de más de 36°C. Después de la adición de todo el precipitado, la mezcla se incubó durante 1 hora a 40°C.

15 Se ensayaron tres tandas de precipitado distintas. En cada caso, el método 2 de redisolución tuvo por resultado una capacidad de filtración significativamente más alta. El peso final de filtrado y la concentración de fibrinógeno fue también más alta de una forma consistente, lo que tiene por resultado mejores rendimientos de fibrinógeno (véase la Tabla 11).

TABLA 11

Tanda	Método de redisolución	Escala de filtración ¹	Capacidad ² del filtro Cuno 05SP (Kgm ⁻²)	Capacidad ² del filtro Cuno 30LA (Kgm ⁻²)	Capacidad ² del filtro Sartobran 0,65/0,45 mm (Kgm ⁻²)	Rendimiento de fibrinógeno ³ (%)
A	1	Pequeña	10,66	4,57	3,57	64
A	2	Pequeña	26,31	26,10	17,51	No ensayado
A	2	Piloto	> 23,57	> 23,72	> 13,96	82
B	1	Pequeña	4,33	4,57	3,47	29
B	2	Pequeña	13,40	13,16	11,69	No ensayado
C	1	Pequeña	9,63	8,73	8,48	58
C	2	Piloto	>21,66	> 22,92	> 13,96	81

Notas:

¹ Área de filtración a escala pequeña = 0,00173 m²; área de filtración a escala piloto = 0,3 m². La presión de aire inicial aplicada durante la filtración fue 0,25 bares (25.000 Pa) a escala pequeña y 0,1 - 0,2 bares (10.000 - 20.000 Pa) a escala piloto.

² La capacidad de filtración se calcula como la cantidad máxima de material resolubilizado dividida por el área del filtro. Los ejemplos que indican capacidades "mayores que" no bloquearon el filtro bajo las condiciones experimentales.

³ El rendimiento de fibrinógeno se calcula en este caso como los mg de fibrinógeno recuperado del filtro (= concentración recuperada mgmL⁻¹ x mL de filtrado recogido) dividido por los mg de fibrinógeno que había en este volumen de material de partida (= concentración aplicada mgmL⁻¹ x mL de filtrado recogido) x 100(%).

REIVINDICACIONES

1. Un método para la separación y purificación de fibrinógeno y plasminógeno, que comprende las etapas de:

(a) cargar una solución que comprende fibrinógeno y plasminógeno en una matriz de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados, bajo unas condiciones tales que el fibrinógeno y el plasminógeno se unen ambos a la matriz, y

(b) eluir selectivamente el fibrinógeno y el plasminógeno separadamente de la matriz.

2. Un método para la separación de fibrinógeno de plasminógeno, que comprende las etapas de:

(a) cargar una solución que comprende fibrinógeno y plasminógeno en una matriz de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados, bajo unas condiciones tales que al menos el fibrinógeno se une a la matriz, y

(b) eluir selectivamente el fibrinógeno de la matriz.

3. Un método según la reivindicación 2ª, en el que el plasminógeno y el fibrinógeno son eluidos de la matriz selectivamente por separado.

4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la solución que comprende fibrinógeno es una fracción de plasma que contiene fibrinógeno.

5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la solución que comprende fibrinógeno comprende además factor XIII, y el factor XIII es co-eluido de la matriz con el fibrinógeno.

6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además la etapa de concentrar el fibrinógeno mediante ultrafiltración hasta una concentración de 15 a 30 mg/ml.

7. El método según la reivindicación 6ª, que comprende además las etapas de:

combinar el fibrinógeno con una combinación de estabilizantes adecuados para formar una formulación de fibrinógeno;

esterilizar el fibrinógeno mediante filtración; y

liofilizar la formulación de fibrinógeno para formar una formulación de fibrinógeno liofilizada.

8. El método según la reivindicación 7ª, en el que los estabilizantes incluyen un aminoácido, un hidrato de carbono, una sal y un detergente.

9. El método según la reivindicación 7ª o la reivindicación 8ª, que comprende además la etapa de someter la formulación de fibrinógeno liofilizada a un tratamiento térmico en seco.

10. El uso de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados, para la separación de fibrinógeno del plasminógeno.

11. El uso de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados, para la separación y purificación de fibrinógeno y plasminógeno.