



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 282 644**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/74 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03738334 .6**

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

(87) Número de publicación de la solicitud: **1520018**

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

(54) Título: **Procedimiento para preparación de trombina víricamente inactivada.**

(30) Prioridad: **10.07.2002 GB 0216002**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

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

(72) Inventor/es: **Connolly, Caroline;
Hardway, Christopher;
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

Procedimiento para preparación de trombina víricamente inactivada.

5 La presente invención se refiere a procedimientos para la preparación de trombina víricamente inactivada, y a los productos preparados mediante dichos procedimientos.

10 La trombina es una proteasa plasmática multifuncional generada en la corriente sanguínea a través de la activación de su precursor inactivo, protrombina (conocido también como factor II). La protrombina se activa mediante la acción del factor X activado (factor Xa). Una de las principales funciones de la trombina en el plasma sanguíneo es convertir el fibrinógeno soluble en fibrina insoluble, en la etapa final de la cascada de la coagulación sanguínea. Los monómeros de fibrina producidos mediante la acción de la trombina se agrupan entre sí y luego se reticulan para formar un coágulo sanguíneo. La trombina se usa en terapia, tanto sola como en combinación con fibrinógeno, en los denominados obturadores de fibrina para lograr la hemostasis, destinada a cerrar heridas y para la adhesión controlada de tejido.

15 Para todas las aplicaciones clínicas, es importante tener trombina muy pura, a fin de minimizar cualquier efecto secundario resultante, por ejemplo, de la presencia de otras proteasas o factores de coagulación, u otros componentes contaminantes. Además, es muy deseable que la trombina para uso clínico, en particular si se deriva de fuentes humanas o animales, se trate para inactivar cualquier virus existente en la sangre que pueda estar presente, por ejemplo virus de la hepatitis o VIH. Se conocen en la técnica diversos métodos de inactivación vírica, incluyendo pasteurización, tratamiento con calor seco y tratamiento con disolvente-detergente (Pathogen inactivation of labile blood products, Council of Europe Expert Committee in Blood Transfusion Study Group on Pathogen Inactivation in Labile Blood Products, Transfusion Medicine, 2001, 11, 149-175). También es deseable que se eliminen o reduzcan otros patógenos, por ejemplo, los agentes productores de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), que actualmente se cree que son priones.

20 El tratamiento con calor seco se sabe que es efectivo para la inactivación, tanto de virus con envuelta, como de algunos virus sin envuelta, mientras que el tratamiento de disolvente-detergente se sabe que es efectivo para la inactivación de virus con envuelta (es decir, con envuelta lipídica), como la hepatitis B. El tratamiento con disolvente-detergente es actualmente un método usado normalmente para la inactivación vírica de productos sanguíneos destinados a uso clínico.

25 En el pasado, la activación de protrombina a trombina se provocaba a menudo mediante la adición de iones calcio y tromboplastina (factor III). La tromboplastina se derivaría de fuentes humanas o animales y era, por tanto, una fuente de posible contaminación del producto final.

30 El documento US 5.304.372 describe un procedimiento para la preparación de un concentrado de trombina humana a partir de la fracción PPSB del plasma. El procedimiento comprende la activación de la protrombina en la fracción PPSB, para producir trombina mediante la adición de cloruro cálcico, seguida de tratamiento de disolvente-detergente sobre el producto resultante, para inactivar los virus. Según el documento US 5.304.372, el tratamiento con disolvente-detergente no se puede realizar sobre la materia prima PPSB, porque eliminaría otros factores, como los fosfolípidos, necesarios para la reacción de activación de protrombina a trombina.

35 El documento EP-A-0.378.798 describe un procedimiento para la preparación de trombina, que comprende absorber el factor II del plasma o de fracciones plasmáticas, sobre un vehículo sólido, activar el factor II sobre el vehículo sólido hasta trombina, y luego eluir la trombina.

40 El documento US 5.714.370 describe la preparación de trombina a partir de protrombina víricamente inactivada, usando sales activas para coagulación para efectuar la activación de la protrombina a trombina. El único método descrito para la inactivación vírica de la protrombina es el tratamiento térmico.

45 El documento 1993 Annual Report de la Dr. Karl Landsteiner Foundation on research at CLB (The Central Laboratory of the Netherlands Red Cross blood transfusion service), también describe en la página 10 que la activación de protrombina tratada con disolvente-detergente para formar trombina con iones de calcio, sólo tenía éxito en presencia de fosfolípidos añadidos.

50 Sería ventajoso proporcionar un método para la preparación de trombina a partir de protrombina que se haya sometido a una etapa de inactivación vírica por disolvente-detergente para eliminar los virus con envuelta. También sería ventajoso evitar completamente el uso de otros productos biológicos y, particularmente, derivados de animales, por ejemplo tromboplastina, para activar la protrombina, ya que tales productos pueden servir como una fuente de virus infecciosos u otros contaminantes no deseables, durante el procedimiento de fabricación.

55 En un aspecto, la presente invención proporciona por tanto un primer método para la preparación de trombina víricamente inactivada, que comprende las etapas de:

(a) inactivación vírica por disolvente-detergente, de una solución que comprende protrombina y factor X;

(b) carga del producto de la etapa (a) en un medio de intercambio de aniones;

(c) lavado del medio para eliminar los reactivos usados para la inactivación vírica por disolvente-detergente en la etapa (a); y

(d) activación de la protrombina del medio para formar trombina mediante la adición de iones metálicos. Preferiblemente, los iones metálicos son iones metálicos divalentes, como iones magnesio y/o calcio.

Preferiblemente, la trombina se eluye a continuación selectivamente desde el medio de intercambio de aniones.

Alternativamente, se puede cargar una solución que comprende protrombina y factor X en un medio de intercambio aniónico y la inactivación vírica por disolvente-detergente se puede realizar sobre el medio. La presente invención, por tanto, proporciona también una alternativa al método anterior, en la que las etapas (a) y (b) se reemplazan por las etapas (a') y (b'):

(a') cargar una solución que comprende protrombina y factor X en un medio de intercambio aniónico; y

(b') inactivación vírica por disolvente-detergente de la protrombina y factor X en el medio. Las etapas restantes de este método alternativo son idénticas a las etapas restantes del primer método descrito anteriormente. El método que comprende las etapas (a) y (b) se prefiere frente al método que comprende las etapas (a') y (b'), ya que es más fácil verificar la realización de las condiciones de inactivación necesarias, antes de cargar en el medio.

La materia prima para el procedimiento de la invención puede ser cualquier solución que comprenda protrombina y factor X, incluyendo fracciones plasmáticas o protrombina y/o factor X derivados mediante expresión génica, por ejemplo en cultivo celular o especies transgénicas y protrombina y/o factor X producidos mediante otros métodos sintéticos. La materia prima se puede preparar mediante cualquier método conocido adecuado en la técnica. Preferiblemente, la materia prima es un complejo de protrombina o uno de sus derivados, que contiene protrombina y factor X. El complejo de protrombina se puede preparar mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante adsorción sobre medios de intercambio aniónico a partir de sobrenadante de crioprecipitado y posterior elución (P.A. Feldman, L. Harris, M.E. Haddon, D.R. Evans y J.K. Smith, *Thrombosis Research*, 1986, Suplemento VI:36, incorporado aquí mediante referencia). En una realización preferida, la materia prima es un concentrado de complejo de protrombina (PCC), que se ha preparado en condiciones que minimizan la concentración de factor de coagulación VII y factores de coagulación activados, en el complejo de protrombina. El denominado "PCC de tres factores" es, por tanto, una materia prima más preferida que el "PCC de cuatro factores".

La etapa de inactivación vírica por disolvente-detergente se realiza usando reactivos y métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 4.481.189, US 4.613.501 y US 4.540.573, todos incorporados aquí mediante referencia). Disolventes adecuados incluyen tri-n-butil-fosfato (TNBP). Detergentes adecuados incluyen polisorbato (Tween) 80, polisorbato (Tween) 20 y Triton X-100. Una combinación particularmente adecuada es polisorbato 80 y TNBP. En una realización preferida, la protrombina y la solución que contiene factor X se agitan con los reactivos disolvente y detergente. La inactivación vírica se realiza a una temperatura y durante un tiempo suficiente para inactivar cualquier virus con envuelta que pueda estar presente. Por ejemplo, el tratamiento de disolvente-detergente se puede realizar durante aproximadamente de 1 hora a aproximadamente 24 horas, a una temperatura de aproximadamente 4° a aproximadamente 37°C, por ejemplo, al menos aproximadamente 6 horas a una temperatura de aproximadamente 23-27°C.

La solución que contiene protrombina y factor X tratada con disolvente-detergente se carga a continuación en un intercambiador aniónico adecuado, en condiciones tales que la protrombina y el factor X se unan a los medios de intercambio aniónicos. Si es necesario, la solución tratada con disolvente-detergente se diluye primero para reducir la fuerza iónica a una que sea adecuada para unir la protrombina y el factor X al intercambiador aniónico. Están disponibles comercialmente medios de intercambio aniónico adecuados, e incluyen DEAE Sefarosa CL6B, suministrado por Amersham Biosciences y Fractogel EMBD DEAE 650 (S), suministrado por Merck. Preferiblemente, el medio de intercambio aniónico esta presente en una columna para facilitar el lavado y elución. Preferiblemente, si se usaba un medio de intercambio aniónico durante la preparación de la materia prima, por ejemplo, para la captura de protrombina y/o factor X a partir de una fuente de material como el plasma, se usaba el mismo medio de intercambio aniónico para el procedimiento de la invención, a fin de minimizar la exposición a reactivos diferentes.

Después de la carga, el medio de intercambio aniónico se lava con uno o más tampones de lavado adecuados, para eliminar la proteína no unida o unida débilmente y los reactivos de disolvente-detergente. Los tampones de lavado deberían estar exentos de reactivos que puedan generar trombina a partir de la protrombina unida.

La protrombina unida se activa a continuación para formar trombina, mediante la adición de iones metálicos adecuados, preferiblemente iones metálicos divalentes, como iones magnesio o calcio, con la máxima preferencia iones calcio. Se pueden usar combinaciones de más de un tipo de ión metálico para la activación, por ejemplo, una mezcla de iones calcio y magnesio. Preferiblemente, los iones metálicos se añaden en forma de un tampón de activación, y están presentes en una concentración de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 40 mM, más preferiblemente entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 17 mM, y con la máxima preferencia, aproximadamente 2 mM, en el tampón.

La protrombina unida se incuba con los iones metálicos durante un tiempo suficiente y a una temperatura adecuada para que se realice la reacción de activación. La temperatura debería de ser suficientemente elevada para que la reacción se produzca, pero no tan alta como para que las proteínas presentes se desnaturalicen o se favorezca el crecimiento de cualquier microorganismo contaminante. La reacción se realiza preferiblemente a una temperatura de 26°C o inferior, por ejemplo a 10°C-26°C, más preferiblemente a temperatura ambiente, aproximadamente, (20°C) o inferior, durante aproximadamente 19-85 horas, más preferiblemente 19-65 horas, e incluso más preferiblemente durante aproximadamente 40-65 horas. Por ejemplo, unas condiciones de incubación adecuadas serían durante aproximadamente 65 horas a aproximadamente 20°C.

Sin querer vincularse a ninguna teoría, se cree que es la combinación de los iones metálicos (p.ej. calcio) y el medio de intercambio aniónico al que está unida la protrombina, lo que permite la activación de la protrombina para formar trombina, sin necesidad de añadir ningún activador adicional, por ejemplo, tromboplastina. Los iones metálicos activan el factor X contenido en la fracción adsorbida para formar factor Xa, y el factor Xa, a su vez, activa la protrombina para formar trombina. También es posible cargar factor X víricamente inactivado por disolvente-detergente en el medio de intercambio aniónico, y activarlo para formar factor Xa, mediante adición de iones metálicos antes de añadir la protrombina al medio de intercambio aniónico. El factor Xa convierte a continuación la protrombina en trombina sobre el medio.

La presente invención proporciona también, por tanto, un segundo método para la preparación de trombina víricamente inactivada, que comprende las etapas de:

- (a) inactivación vírica mediante disolvente-detergente de una solución que comprende factor X;
- (b) carga del producto de la etapa (a) en un medio de intercambio aniónico;
- (c) lavado del medio para eliminar los reactivos usados para la inactivación vírica mediante disolvente-detergente en la etapa (a);
- (d) activación del factor X en el medio para formar factor Xa mediante la adición de iones metálicos; y
- (e) carga de la protrombina víricamente inactivada sobre el medio de intercambio aniónico, de forma que se produzca trombina.

Preferiblemente, la trombina se eluye luego selectivamente desde el medio de intercambio aniónico. También preferiblemente, los iones metálicos son iones metálicos divalentes como iones magnesio y/o calcio.

La materia prima para el segundo procedimiento de la invención puede ser cualquier solución que comprenda por separado protrombina y factor X, incluyendo fracciones plasmáticas, protrombina y/o factor X derivado mediante expresión génica, por ejemplo en cultivo celular o especies transgénicas, y protrombina y/o factor X producido mediante cualquier otro método sintético. Las materias primas se pueden preparar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Las condiciones adecuadas de inactivación vírica, carga y activación para el segundo método de la invención son según se describieron anteriormente para el primer método de la invención.

Después de la activación del factor X para formar factor Xa, el medio de intercambio aniónico se puede lavar opcionalmente usando un tampón adecuado para eliminar los iones metálicos antes de añadir la protrombina.

Después de la conversión de protrombina en trombina, la trombina se puede recuperar mediante elución con un tampón de recuperación adecuado. La fuerza iónica y pH del tampón de recuperación se eligen preferiblemente para eliminar selectivamente la trombina y dejar otras proteínas, por ejemplo cualquier protrombina sin convertir, unidas al medio de intercambio aniónico. El pH del tampón de recuperación usado debería ser inferior al pI de la trombina, de forma que la trombina no se una al intercambiador aniónico. Un pH adecuado para el tampón de recuperación es el pH 8. Preferiblemente, los tampones usados para lavado, activación y recuperación, no contienen ninguna sal de fosfato, a fin de evitar la precipitación de fosfato cálcico insoluble durante el procedimiento de fabricación.

La trombina producida es muy purificada y concentrada, y se puede formular directamente sin purificación adicional. Alternativamente, se pueden realizar etapas de purificación adicionales si se desea. Por ejemplo, la solución de trombina obtenida de los medios de intercambio aniónicos se puede someter a reducción vírica adicional o etapas de inactivación. Por ejemplo, la solución se puede filtrar a través de un filtro de eliminación de virus, como el filtro Plana Nova 15N. Tal filtración puede servir también para eliminar la sustancia causante de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET).

Una vez separado del medio de intercambio aniónico, el producto de trombina se puede formular para almacenamiento a largo plazo antes de su uso clínico. Preferiblemente, la solución de trombina se criodeseca, opcionalmente en presencia de uno o más estabilizadores, para ayudar a limitar la desnaturalización durante la criodesecación y cualquier tratamiento térmico posterior. Estabilizadores adecuados incluyen carbohidratos, como sacarosa, rafinosa o trehalosa e iones metálicos divalentes, como iones calcio. Se prefiere particularmente una combinación de iones calcio y un carbohidrato como sacarosa. Preferiblemente, se evita el uso de estabilizadores proteínicos como albúmina, para minimizar posibles fuentes de contaminación del producto final.

Las condiciones de criodesecación adecuadas incluyen secado primario a una temperatura de aproximadamente -35°C y a una presión de aproximadamente 10-13 Pa, seguido de secado secundario a una temperatura de aproximadamente +35°C y una presión de aproximadamente 3 Pa.

5 El producto de trombina criodesecado se puede someter a una etapa de inactivación vírica adicional mediante tratamiento térmico, por ejemplo calentamiento hasta aproximadamente 80°C durante aproximadamente 72 horas o 100°C durante 24 horas. Se ha descubierto que una combinación de iones calcio y un carbohidrato como sacarosa, estabiliza eficientemente la trombina producida según la invención, durante el tratamiento térmico terminal para inactivar los virus.

10 Es deseable que los productos hemoderivados se sometan al menos a dos etapas de inactivación o reducción vírica separados durante la fabricación. Una ventaja del procedimiento de la invención es que permite realizar múltiples etapas de inactivación o reducción vírica diferentes, a fin de inactivar o reducir, tanto los virus con envuelta como sin envuelta, y otros patógenos, por ejemplo, las sustancias causante de las EET. Se sabe que el tratamiento con disolvente-detergente disgrega la envuelta lipídica de los virus con envuelta, mientras que la filtración separa partículas superiores a un determinado tamaño y el tratamiento térmico inactiva virus térmicamente inestables. Es deseable incorporar múltiples etapas de inactivación o reducción, que estén basadas en diferentes principios, a fin de eliminar o reducir tantos patógenos diferentes como sea posible. En una realización preferida, el procedimiento comprende una etapa de inactivación o reducción vírica adicional, además del tratamiento con disolvente-detergente. En una realización con mayor preferencia, el procedimiento comprende dos etapas de reducción o inactivación vírica adicionales, además del tratamiento con disolvente-detergente. Preferiblemente, el procedimiento comprende una etapa de eliminación física de virus (p.ej. nanofiltración) y una etapa de inactivación vírica mediante calor seco, además del tratamiento con disolvente-detergente.

25 Otra ventaja del procedimiento de la invención es que la activación de la protrombina y la purificación de la trombina resultante, se puede lograr usando el mismo tipo de medio de intercambio aniónico que se usó previamente para preparar las materias primas de protrombina y factor X. La formulación del producto utiliza también reactivos que se han usado ya en el procedimiento de preparación. Esto minimiza la exposición de la trombina a una multiplicidad de reactivos, lo cual es beneficioso para la fabricación de un producto farmacéutico. Una ventaja adicional del procedimiento es que minimiza la amenaza de la integridad de otras operaciones de fabricación planteada por posible contacto con la proteasa de trombina, muy potente. Esto se puede evitar normalmente sólo mediante segregación de la planta de fabricación de trombina de otro equipamiento y actividades en la fábrica. Tal segregación es cara y laboriosa. Asimismo, el tratamiento de intermediarios víricamente inactivados (p.ej. tratados con disolvente-detergente) se tiene que realizar en un área de fabricación separada, aislada, para evitar cualquier contaminación posterior. La incapacidad del estado de la técnica previo de generar trombina después del tratamiento de disolvente-detergente, requería el uso de un espacio de fabricación significativamente más segregado y riesgos adicionales en la manipulación del producto durante la transferencia entre etapas. Adicionalmente, existía también el riesgo potencial para el personal de fabricación derivado de la manipulación de una proteasa que puede tener efectos trombóticos significativos si se introduce de forma inadvertida en su circulación. Estos problemas se minimizan mediante el uso del procedimiento de la invención porque:

(a) el tratamiento con disolvente-detergente previo significa que la trombina producida no se tiene que tratar en numerosas áreas de fabricación diferentes, cada una de las cuales tendría que aislarse de otras actividades;

45 (b) el número de etapas de fabricación (particularmente tras la producción de trombina a partir de protrombina) se minimiza; y

(c) el rendimiento es suficiente para proporcionar cantidades significativas de trombina a partir de volúmenes muy pequeños.

50 Por tanto, la contención del procedimiento se simplifica mucho.

También es ventajoso limitar la exposición del producto a múltiples reactivos diferentes durante la fabricación, ya que dichos reactivos pueden servir como una fuente de contaminación o modificación no deseadas del producto. Minimizar el número de reactivos y etapas requeridas para la fabricación de trombina a partir de protrombina es una ventaja adicional del procedimiento de la invención.

La trombina preparada usando el procedimiento de la invención se puede usar clínicamente, bien sola o en combinación con fibrinógeno en un kit de compuesto obturador de fibrina.

60 A continuación se realiza una descripción detallada de las realizaciones preferidas del procedimiento de la invención.

Eliminación de crioprecipitado del plasma

65 El plasma humano congelado se acondiciona en torno a -11°C, se descongela hasta aproximadamente +1°C y el crioprecipitado se recoge mediante centrifugación. El sobrenadante se denomina sobrenadante del crioprecipitado (CPS).

ES 2 282 644 T3

Captura del complejo de protrombina del sobrenadante del crioprecipitado

Adsorción del complejo de protrombina del sobrenadante del crioprecipitado

- 5 Se añade medio de intercambio aniónico, como DEAE Sefarosa CL-6B, a CPS, en proporciones de, por ejemplo, ~10 ml de medio de intercambio aniónico introducido como relleno, por kilogramo de CPS. La mezcla se agita durante un tiempo adecuado y, a continuación, se recupera el medio (incluyendo la proteína adsorbida) desde el CPS, por ejemplo mediante centrifugación.

10 *Elución del complejo de protrombina*

- El medio de intercambio aniónico recuperado se pone en suspensión en un tampón adecuado y se introduce como relleno en una columna de cromatografía. El medio se lava con un tampón pobre en sales, para eliminar proteínas unidas débilmente y no deseadas. Las condiciones de carga y lavado se controlan para minimizar específicamente la concentración de factor VII de coagulación y factores de coagulación activados en el complejo de protrombina eluido. El medio se lava luego con un tampón de elución rico en sales, para recuperar el complejo de protrombina. El pico de proteína se recoge selectivamente para evitar la contaminación del complejo de protrombina con factores de coagulación activados. El eluato se puede almacenar congelado.

20 *Tratamiento con disolvente-detergente*

- La solución de complejo de protrombina se filtra a través de un filtro de tamaño de poro de 0,45 μm o inferior. A continuación se añaden los reactivos disolvente-detergente y la mezcla se agita a una temperatura y durante un período de tiempo conocido, para inactivar cualquier virus con envuelta que pueda estar presente.

25 *Cromatografía de activación de protrombina*

Dilución del complejo de protrombina tratado con disolvente-detergente

- 30 El complejo de protrombina tratado con disolvente-detergente se diluye luego, por ejemplo, con agua, para reducir la fuerza iónica de la solución hasta una que sea adecuada para unión sobre un intercambiador aniónico.

Carga del segundo intercambiador aniónico

- 35 La solución de proteína diluida se bombea a través de una columna que contiene un relleno de medio de intercambio aniónico. Ventajosamente, éste puede ser el mismo medio que se usó para la preparación de la protrombina y factor X de CPS u otra fuente. La contaminación microbiológica durante la producción de trombina se minimiza mediante desinfección adecuada del medio de intercambio aniónico y mediante filtración de los tampones para eliminar la contaminación bacteriana (p.ej., mediante el uso de filtros de 0,2 μm). El medio se lava con el tampón usado para equilibrar la columna, para eliminar proteína unida débilmente y los reactivos disolvente-detergente, y para equilibrar el medio con sales de tampón, que son las más favorables para etapas de tratamiento posteriores. El medio se lava a continuación con un volumen de aproximadamente 1 columna de un tampón que contiene calcio, por ejemplo el tampón de equilibrado más cloruro cálcico 2 mM.

45 *Incubación de activación*

- Las salidas de la columna se precintan y la columna se mantiene a una temperatura predeterminada durante un período de tiempo definido, por ejemplo, 65 horas a 20°C. Durante la incubación, la protrombina se convierte en trombina.

50 *Recuperación de la trombina*

- Al final de la incubación, la columna se lava con el tampón de equilibrado para recuperar la trombina. Las proteínas no afectadas por la incubación de activación permanecen unidas al medio, ya que las condiciones usadas para este lavado, en términos de pH, componentes de tampón y fuerza iónica, son las mismas que las usadas para el lavado después de cargar la columna. La trombina no se une a intercambiadores aniónicos a pHs inferiores a su pI, de forma que se elimina mediante lavado por el tampón. Por ejemplo, a pH 8 la trombina no se une a intercambiadores aniónicos, pero su precursor, protrombina, sí se une.

- 60 El pico que se eluye se recoge en fracciones, los primeros volúmenes del efluente de la columna son de trombina de baja pureza y contienen la mayoría de cualquier trombina degradada o dañada que pueda estar presente. Los siguientes volúmenes de la columna son de elevada pureza y, si se separan de los primeros volúmenes de columna, se pueden usar sin purificación adicional. Alternativamente, todo el efluente de la columna se puede recoger y purificarse nuevamente.

65

Filtración de virus

Se puede usar una etapa de reducción vírica adicional. El eluato de columna que contiene trombina se puede filtrar a través de un filtro de eliminación de virus validado, como un filtro Planova 15N. Tal filtración puede eliminar o reducir también otros patógenos, por ejemplo, las sustancias causantes de EET.

Formulación

La trombina se formula y se ajusta ahora a su actividad elegida como objetivo para almacenamiento a largo plazo antes de su uso clínico. Un método recomendado es la adición de un carbohidrato, como sacarosa, y calcio, a una concentración de cloruro sódico elegida como objetivo, y luego, criodesecación de la solución. Antes de criodesecar el producto formulado, se puede filtrar a través de un filtro esterilizador (p.ej., un filtro de 0,2 μ m), según se requiera para el uso farmacéutico.

15 *Tratamiento térmico final*

La formulación criodesecada se puede termotratarse finalmente para inactivar cualquier virus que pueda estar presente.

La trombina preparada usando el procedimiento de la invención se puede usar clínicamente, bien sola o en combinación con fibrinógeno en un kit de producto obturador de fibrina. La presente invención proporciona también, por tanto, la trombina obtenida según el procedimiento de la invención, para uso en terapia, y kits farmacéuticos que comprenden la trombina obtenida según el procedimiento de la invención, en combinación con fibrinógeno. Se prefieren kits que comprendan trombina preparada según el procedimiento de la invención, y fibrinógeno preparado según la Solicitud de Patente del Reino Unido del solicitante, en tramitación junto con la presente, titulada "Process and Composition", presentada el 10 de Julio de 2002.

La invención se ilustrará más mediante los siguientes Ejemplos no limitativos.

La preparación de PCC se describe en: Feldman P.A., Bradbury P.I., Williams J.D., Sims G.E.C., McPhee J.W., Pinnell M.A., Harris L., Crombie G.I., Evans D.R., "Large scale preparation and biochemical characterisation of a new high purity factor IX concentrate prepared by metal chelate affinity chromatography", Blood Coagulation and Fibrinolysis 1994; 5:939-948.

El pH de las soluciones se ajustó usando concentraciones adecuadas de hidróxido sódico, para incrementar el pH, o ácido clorhídrico para reducir el pH.

La trombina se midió mediante ensayo de coagulación, que mide el tiempo para coagular una muestra de fibrinógeno y/o mediante prueba cromogénica que medía la absorbancia de un cromóforo liberado mediante escisión de un péptido sintético en la que interviene trombina. Tales métodos de ensayo son conocidos para los expertos en la técnica.

Prueba de coagulación de trombina

El estándar se calibra frente a un estándar aceptado internacionalmente, y se diluye en un tampón de ensayo, como trometamol 50 mM, cloruro sódico 100 mM, albúmina al 1%, pH 7,5, hasta un intervalo adecuado de concentraciones, por ejemplo, 1 a 7 ui/ml. Las muestras se diluyen hasta este intervalo de concentraciones.

Los tiempos de coagulación de las soluciones de trombina diluidas se miden después de la adición de fibrinógeno humano a una concentración determinada. La relación entre las muestras de ensayo y el estándar, permite entonces el cálculo de la concentración de trombina en la muestra, expresada en unidades internacionales (ui) por ml.

Prueba cromogénica de trombina

El estándar se calibra frente a un estándar aceptado internacionalmente, y se diluye en un tampón de ensayo, tal como trometanol 50 mM, cloruro sódico 100 mM, albúmina al 0,1%, pH 7,3, hasta un intervalo adecuado de concentraciones, por ejemplo, 0,5 a 5 ui/ml. Las muestras se diluyen hasta este intervalo de concentraciones.

La trombina diluida se añade luego a un sustrato cromogénico (por ejemplo S-2238 de Chromogenix) y la mezcla se incuba durante un período definido de tiempo. La reacción se detiene luego mediante adición, por ejemplo, de ácido acético. Luego se mide la absorbancia de la solución a 405 nm (para S-2238). La concentración de trombina es proporcional al color desarrollado, y la concentración de la muestra se puede interpolar a partir de la línea estándar.

ES 2 282 644 T3

Ejemplo 1

Cromatografía de activación de protrombina

5 *Tampones de trometamol e incubación a 20°C durante 62,5 horas*

Se diluyeron 1,19 kg de complejo de protrombina tratado con disolvente-detergente con 2,50 kg de agua, para reducir su conductividad de 26,4 mS/cm a 9,28 mS/cm. La solución se concentró entonces hasta pH 8,0. Esta solución se cargó sobre una columna recubierta de 5 cm de diámetro, rellena con un lecho de DEAE Sefarosa CL6B, de 13 cm de alto, equilibrada con trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, pH 8,0. Después de la carga, el medio se lavó con 15 volúmenes de columna de trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, pH 8,0, para eliminar los reactivos detergente y disolvente y proteína unida débilmente. El medio se lavó luego con 1 volumen de columna de trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, cloruro cálcico 2 mM, pH 8,0. Se cerraron las salidas de la columna. Se hizo circular agua a 20°C a través de la cubierta.

Después de 62,5 horas, se detuvo la circulación de agua. El medio se lavó con trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, pH 8,0, para recuperar la trombina producida durante la incubación. Los primeros 3 volúmenes de columna de efuyente de columna, que contenían 3,8 millones de unidades internacionales de actividad coagulante de trombina se desecharon, ya que la actividad coagulante específica era inferior a 2000 ui/mg de proteína total. Los siguientes 11 volúmenes de columna de efuyente, que contenían 2,8 millones de ui de actividad coagulante tenían una actividad específica de 2400 ui/mg, y se agruparon para su tratamiento posterior, sin necesidad de etapas de purificación de proteína adicionales.

Ejemplo 2

25 *Cromatografía de activación de protrombina*

Tampones de citrato-fosfato y DEAE Sefarosa

Se diluyeron 4,4 kg de complejo de protrombina tratado con disolvente-detergente, con 6,3 kg de agua, para reducir su conductividad hasta 9,3 mS/cm. La solución se concentró a continuación hasta pH 8,0. Se cargaron 7,1 kg de esta solución sobre una columna de 9 cm de diámetro, rellena con un lecho de DEAE Sefarosa CL6B de 12,5 cm de alto, equilibrado con citrato 8 mM, fosfato 10 mM y cloruro sódico 68,5 mM, pH 8,0. Después de la carga, el medio se lavó con 11 volúmenes de columna de citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro sódico 68 mM, pH 8,0, para eliminar los reactivos disolvente y detergente y la proteína unida débilmente. El medio se lavó luego con 1 volumen de columna de citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro sódico 64 mM, cloruro cálcico 2 mM, pH 8,0. Se cerraron las salidas de la columna. La columna se almacenó a temperatura ambiente.

Después de aproximadamente 64 horas, en medio se lavó con citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro sódico 68 mM, pH 8,9, para recuperar la trombina producida durante la incubación. Se recuperaron de la columna un total de 11 millones de ui de actividad de coagulación, de las cuales 3,8 millones tenían una actividad específica > 2000 ui/mg y se agruparon para tratamiento posterior, sin necesidad de etapas de purificación de proteína adicionales.

Ejemplo 3

45 *Cromatografía de activación de protrombina*

Tampones de citrato-fosfato y Fractogel EMD DEAE 650(s)

Se diluyeron 148 ml de complejo de protrombina tratado con disolvente-detergente, con 121 ml de citrato 8 mM, fosfato 10 mM, pH 9,0, para reducir su conductividad hasta 16 mS/cm. La solución se concentró luego hasta pH 8,0. Se cargaron 111 g de esta solución en una columna de 1 cm de diámetro, rellena con 10 ml de Fractogel EMD DEAE 650(s), equilibrada con citrato 8 mM, fosfato 10 mM y cloruro sódico 137 mM, pH 8,0. Tras la carga, el medio se lavó con 12 volúmenes de columna de citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro sódico 137 mM, pH 8,0, para eliminar los reactivos disolventes y detergentes y la proteína unida débilmente. El medio se lavó luego con 1 volumen de columna de citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro sódico 129 mM, cloruro cálcico 2 mM, pH 8,0. Se cerraron las salidas de la columna. La columna se almacenó a temperatura ambiente.

Después de aproximadamente 64 horas, el medio se lavó con citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro sódico 129 mM y cloruro cálcico 2 mM, pH 8,0, para recuperar la trombina producida durante la incubación. Se recuperaron de la columna un total de 0,4 millones de ui de actividad de coagulación, de las cuales 0,3 millones tenían una actividad específica > 2000 ui/mg y se agruparon para tratamiento posterior, sin necesidad de etapas de purificación de proteína adicionales.

65

ES 2 282 644 T3

Ejemplo 4

Tampones de trometamol e incubación a 10, 14,5 y 22°C durante aproximadamente 64 horas

- 5 Se diluyeron 195 ml de complejo de protrombina tratado con disolvente-detergente, con 424 g de agua, para reducir su conductividad de 28,9 mS/cm hasta 9,39 mS/cm. La solución se concentró luego hasta pH 8,0 con hidróxido sódico 1 M. Se cargaron aproximadamente 140 g de esta solución en tres columnas de 1 cm de diámetro, rellenas con un lecho de DEAE Sefarosa CL6B de 13 cm de alto, equilibrado con trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, pH 8,0. Después de cargar el medio, se lavó con 10 volúmenes de columna de trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, pH 8,0, para eliminar los reactivos disolvente-detergente y la proteína unida débilmente. El medio se lavó luego con 1 volumen de columna de trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, cloruro cálcico 2 mM, pH 8,0. Se cerraron las salidas de la columna. Una columna se almacenó a temperatura ambiente ($21,8^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$). Las otras se mantuvieron a 10°C y $14,5^{\circ}\text{C}$, haciendo circular aire enfriado a través de las cubiertas de las columnas.
- 15 Después de aproximadamente 64 horas, la temperatura en las cubiertas se cambió hasta 18°C , y luego se detuvo el enfriamiento de la cubierta. El medio se lavó con trometamol 10 mM y cloruro sódico 110 mM, pH 8,0, para recuperar la trombina producida durante la incubación. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Columna	Temperatura de incubación, °C	Actividad de coagulación de trombina	
		Total recuperada, ui	Total >2000 ui/mg, ui
1	10	212.000	149.000
2	14,5	293.000	174.000
3	22	353.000	142.000

Ejemplo 5

Tampones de trometamol e incubación a 10, 23 y 26°C durante aproximadamente 64 horas

- 5 Se diluyeron 458 g de complejo de protrombina tratado con disolvente-detergente, con 977 g de agua, para reducir su conductividad de 28,9 mS/cm hasta 9,39 mS/cm. La solución se concentró luego hasta pH 8,0 con hidróxido sódico 1 M. Se cargaron aproximadamente 140 g de esta solución en tres columnas recubiertas de 1,6 cm de diámetro, rellenas con un lecho de DEAE Sefarosa CL6B de 13 cm de alto, equilibrado con trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, pH 8,0. Tras la carga, el medio se lavó con 10 volúmenes de columna de trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, pH 8,0, para eliminar los reactivos disolvente y detergente y la proteína unida débilmente. El medio se lavó luego con 1 volumen de columna de trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, cloruro cálcico 2 mM, pH 8,0. Se cerraron las salidas de la columna. Luego se hizo circular agua a través de las cubiertas de las columnas a 15° , 23° y 26°C .

Después de 65 horas, se detuvo la circulación de agua. El medio se lavó con trometamol 10 mM y cloruro sódico 110 mM, pH 8,0, para recuperar la trombina producida durante la incubación. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Columna	Temperatura de incubación, °C	Actividad de coagulación de trombina	
		Total recuperada, ui	Total >2000 ui/mg, Ui
1	15	864.000	423.000
2	23	756.000	284.000
3	26	800.000	128.000

Ejemplo 6

Tampones de trometamol e incubación a temperatura ambiente durante 16, 40 y 64 horas

Se diluyeron 248 g de complejo de protrombina tratado con disolvente-detergente, con 523 g de agua, para reducir su conductividad de 26,9 mS/cm hasta 9,33 mS/cm. La solución se concentró luego hasta pH 8,0. Se cargaron aproximadamente 195 g de esta solución en cada una de tres columnas de 1 cm de diámetro, rellenas con un lecho de DEAE Sefarosa CL6B de 13 cm de alto, equilibrado con trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, pH 8,0. Tras la carga, el medio se lavó con 10 volúmenes de columna de trometanol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, pH 8,0, para eliminar los reactivos disolventes y detergentes y la proteína unida débilmente. El medio se lavó luego con 1 volumen de columna de trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, cloruro cálcico 5 mM, pH 8,0. Se cerraron las salidas de la columna. Las columnas se almacenaron a temperatura ambiente.

Las tres columnas se almacenaron durante 16 horas, 40 horas y 64 horas. Al final de cada incubación, el medio se lavó con trometamol 10 mM y cloruro sódico 110 mM, pH 8,0, para recuperar la trombina producida durante la incubación. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

Columna	Temperatura de incubación, °C	Actividad de coagulación de trombina	
		Total recuperada, ui	Total >2000 ui/mg, Ui
1	16	30.700	0
2	40	407.000	197.000
3	64	500.000	158.000

Ejemplo 7

Mecanismo de producción de trombina

Se realizaron experimentos para determinar el mecanismo de activación de protrombina a trombina, en el procedimiento de la invención.

Materiales

Protrombina víricamente inactivada, purificada

Factor X víricamente inactivado, purificado

Antitrombina víricamente inactivada.

La protrombina y el factor X se habían inactivado mediante tratamiento con disolvente y detergente, usando fosfato de tri-n-butilo y polisorbato 80. La antitrombina se había víricamente inactivado mediante termotratamiento.

Método

Se rellenaron tres columnas de cromatografía con gel de intercambio aniónico DEAE Sefarosa CL6B y se equilibraron en tampón de trometamol-NaCl. Las tres columnas se usaron luego según se describe en la Tabla 4, y los productos se ensayaron luego para actividad de trombina.

TABLA 4

Columna 1	Columna 2	Columna 3
Carga de protrombina	Carga de Factor X	Carga de Factor X
Lavado con tampón de equilibrado	Lavado con tampón de equilibrado	Lavado con tampón de equilibrado
Incubación con tampón de calcio	Incubación con tampón de calcio	Incubación con tampón de calcio
Elución con tampón de equilibrado	Lavado con tampón de equilibrado	Lavado con tampón de equilibrado
	Carga de protrombina	Carga de Antitrombina
	Elución con tampón de equilibrado	Lavado con tampón de equilibrado
		Carga de protrombina
		Elución con tampón de equilibrado

Los resultados se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

	Columna 1	Columna 2	Columna 3
Protrombina total cargada, ui	2039	2044	2061
Factor X total cargado aplicado, u	0	1222	1196
Antitrombina aplicada, u	0	0	850
Trombina generada, ui por ui de protrombina	<0,07	113	<0,07

Los resultados muestran que la trombina no se puede producir directamente a partir de protrombina víricamente inactivada exclusivamente por calcio (Columna 1). La trombina se puede producir de protrombina víricamente inactivada mediante incubación con factor X víricamente inactivado, que se ha incubado previamente con calcio, y el calcio se elimina luego antes del contacto con protrombina (Columna 2). La trombina no se puede producir a partir de trombina víricamente inactivada mediante incubación con factor X víricamente inactivado que se ha incubado previamente con calcio, si el factor X/factor Xa se inactiva luego con antitrombina y, tanto el calcio como la antitrombina, se eliminan antes del contacto con protrombina (Columna 3).

El mecanismo de producción de trombina en el procedimiento de la invención requiere que el factor X se active por calcio y la protrombina se activará entonces hasta trombina mediante la acción de factor X activado (es decir, factor

ES 2 282 644 T3

Xa), más que directamente por el calcio. La protrombina aislada no es, por tanto, una materia prima adecuada para uso en el procedimiento de la invención.

Ejemplo 8

Ausencia de producción de trombina usando sólo protrombina purificada y calcio

La protrombina (Factor II) se separó de otras proteínas de factores de coagulación del complejo de protrombina, tras tratamiento virucida con disolvente y detergente, mediante paso a través de una columna de Sefarosa quelante cargada con cobre.

Esta solución de proteína se usó, bien en presencia de los reactivos disolvente y detergente (SD) purificantes conjuntamente, o se separó de los reactivos disolvente y detergente mediante cromatografía repetida sobre gel de intercambio aniónico de DEAE-Sefarosa.

La protrombina en solución se incubó a pH 6,5 con tampón de cloruro cálcico 40 mM a 25°C durante 3 horas. A continuación se midió la actividad de trombina.

Los resultados se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6

Muestras	Actividad de trombina después de 3 horas, ui/ml
Protrombina con SD	menos de 0,05
Protrombina tras la eliminación de SD	menos de 0,05

Los resultados confirman que la protrombina humana aislada no se convertía en trombina sólo mediante la acción de iones calcio tras sufrir un procedimiento de inactivación de virus por disolvente-detergente, independientemente de si los reactivos SD se eliminaban o no antes de la adición de los iones calcio. La protrombina aislada no es, por tanto, una materia prima adecuada para usar en el procedimiento de la invención.

Ejemplo 9

Ausencia de producción de trombina mediante acción del calcio sobre el complejo de protrombina, durante o después del tratamiento con reactivos disolvente-detergente

Se incubaron muestras de tres concentrados de complejo de protrombina diferentes (que contienen factores II, IX y X) con cloruro cálcico 20 mM en solución y se ensayaron para actividad de trombina, tras incubación durante 3 horas y 5 horas.

Las muestras de complejo de protrombina (PCC) derivadas de plasma humano fueron:

A: eluato de PCC de cromatografía de intercambio aniónico de CPS.

B: eluato de PCC que contiene detergente polisorbato 80 al 1% y disolvente tri-n-butil-fosfato (TNBP) al 0,3%.

C: PCC tratado con disolvente-detergente, del cual se había eliminado el disolvente-detergente.

Ninguno de los materiales usados en estos experimentos se activó durante su fabricación, bien intencionada o inintencionadamente, según se determinó mediante las pruebas NAPTT y FCT para factores de coagulación activados.

Los resultados se muestran en la Tabla 7.

TABLA 7

Muestra	Trombina después de 3 horas, ui/ml	Trombina después de 5 horas, ui/ml
A	619	1168
B	menos de 1	3,48
C	menos de 1	2,02

Los resultados muestran que la trombina producida del complejo de protrombina (no activado) en solución era despreciable, después de tratarse con disolvente-detergente, independientemente de si el disolvente-detergente permanecía en la preparación en el momento de la incubación con calcio (comparar los resultados para la muestra A con los de las muestras B y C). Esto confirmaba la enseñanza del estado de la técnica de que el calcio solo no era suficiente para activar el complejo de protrombina tratado con disolvente-detergente. Una característica esencial del procedimiento de la invención, es que el material que contiene protrombina tratada con disolvente-detergente se carga en un medio de intercambio aniónico, a fin de producir trombina.

Ejemplo 10

Activación con calcio o iones magnesio

Se diluyeron 249 ml de complejo de protrombina tratado con disolvente-detergente con 150 ml de agua desionizada, para reducir su conductividad hasta 16 mS/cm. La solución se concentró luego hasta pH 8,0 con hidróxido sódico 1 M. 82 a 87 g de esta solución se cargaron en tres columnas de 1 cm de diámetro, cada una rellena con 10 ml de DEAE Sefarosa CL6B, equilibradas con citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro sódico 137 mM, pH 8. Después de la carga, el medio se lavó con 10 volúmenes de columna de citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro sódico 137 mM, pH 8,0, para eliminar los reactivos disolvente y detergente y la proteína unida débilmente. El medio se lavó a continuación con 1 volumen de columna de tampón de activación, bien citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro sódico 129 mM, cloruro cálcico 2 mM, pH 8,0 (columna 1), o citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro sódico 129 mM, cloruro magnésico 2 mM, pH 8,0 (columna 2) o citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro sódico 129 mM, cloruro cálcico 2 mM, cloruro magnésico 2 mM, pH 8,0 (columna 3). Se cerraron las salidas de la columna. Las columnas se almacenaron a temperatura ambiente. Después de aproximadamente 64 horas, el medio se lavó del tampón de activación, para recuperar la trombina producida durante la incubación. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

TABLA 8

Columna	Actividad cromogénica de trombina total recuperada	Ión metálico en tampón de activación
1	178.000 ui	Calcio
2	66.500 ui	Magnesio
3	256.000 ui	Calcio/magnesio

Ejemplo 11

Formulación

Se formuló una solución de trombina filtrada de virus como en el Ejemplo 1, en trometamol 10 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 40 mM, sacarosa al 2%, pH 7.0, y una actividad ajustada hasta aproximadamente 500 ui de actividad coagulante de trombina/ml.

Se suministraron 5 ml de esta solución en viales de vidrio y se criodesecaron. El material criodesecado se termotrató a 80°C durante 72 horas. En 3 vueltas, se logró una recuperación promedio de 98% de la actividad coagulante de trombina a través de criodesecación, y un promedio de 98% a través de termotratamiento.

Ejemplo 12

Formulación

5 La solución de trombina se formuló a aproximadamente 1250 ui de actividad de coagulación/ml. Todas las formulaciones contenían trometamol 10 mM y cloruro sódico 200 mM a pH 7,0. Adicionalmente, contenían los componentes añadidos mostrados debajo. Las soluciones se cargaron en viales, 2 ml por vial. Los viales se criodesecaron y se trataron con calor seco a 80°C durante 72 horas. A continuación, los viales se reconstituyeron con agua y se ensayaron para determinar la actividad de trombina. La actividad de trombina se comparó con la actividad de trombina en muestras
10 tomadas antes de criodesecar. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9

[Cloruro cálcico], mM	Componentes adicionales	Recuperación de actividad coagulante a través de criodesecación y termotratamiento
2	-	59%
10	-	69%
40	-	88%
2	sacarosa al 1%	88%
2	sacarosa al 2%	93%
2	trehalosa al 1%	98%
2	rafinosa al 1%	88%
2	albúmina humana al 1%	60%
2	PEG 4000 al 1%	78%

Los resultados mostraban que el estabilizador convencional de albúmina no proporciona estabilidad a través de la criodesecación y el termotratamiento. Otras combinaciones de calcio y carbohidrato proporcionaban estabilidad mejorada a través de la criodesecación y termotratamiento.

Ejemplo 13

Formulación de trombina, criodesecación y termotratamiento

45 La solución de trombina se formuló a 500 ui/ml (5 ml de carga). Todas las formulaciones contenían también trometamol 10 mM y sodio 200 mM a pH 7,0, y contenían adicionalmente los componentes mostrados debajo. Las soluciones se cargaron en viales, 5 ml por vial. Los viales se criodesecaron y se termotrataron a 80°C durante 72 horas o 100°C durante 24 horas. A continuación, los viales se reconstituyeron con agua y se ensayaron para determinar la actividad de trombina. La actividad de trombina se comparó con la actividad de trombina en muestras tomadas antes
50 de la criodesecación. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

TABLA 10

[Cloruro cálcico], mM	Componentes adicionales	Volumen de carga, ml	Recuperación de actividad de coagulación a través de criodesecación y termotratamiento	
			80°C/72 horas	100°C/24 horas
2	sacarosa al 2%	5	79%	-
40	sacarosa al 2%	5	97%	89%
2	trehalosa al 1%	5	92%	73%

ES 2 282 644 T3

Los resultados mostraban que la formulación óptima era trometamol 10 mM y sodio 200 mM a pH 7,0, más cloruro cálcico 40 mM y sacarosa al 2%.

Ejemplo 14

Preparación de trombina

Se diluyeron 1,17 kg de complejo de protrombina tratado con disolvente-detergente con 2,58 kg de agua, para reducir su conductividad de 27,5 mS/cm a 9,12 mS/cm. La solución se concentró luego hasta pH 8,0 con hidróxido sódico 0,5 M. Esta solución se cargó en una columna recubierta de 5 cm de diámetro, rellena con un lecho de DEAE Sefarosa CL6B de 13 cm de alto, equilibrado con trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, pH 8,0. El medio se lavó luego con 1 volumen de columna de trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, cloruro cálcico 2 mM, pH 8,0. Se cerraron las salidas de las columnas. Se hizo circular agua a 20°C a través de la cubierta de la columna.

Después de 64 horas, se detuvo la circulación del agua. El medio se lavó con trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, pH 8,0, para recuperar la trombina producida durante la incubación. Los primeros 4 volúmenes de efluente de la columna contenían 4,3 millones de unidades internacionales (ui) de actividad coagulante de trombina, con una actividad coagulante específica de menos de 2000 ui/mg totales de proteína. Los siguientes 9 volúmenes de columna de efluente, que contenían 2,2 millones de ui de actividad coagulante, a una actividad específica de 2100 ui/mg, se congelaron a -40°C y se conservaron para su tratamiento posterior.

900 g del eluato congelado se descongelaron y filtraron usando un filtro de virus Planova 15N que se había equilibrado con trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, pH 8,0. Se producía una recuperación medida de 95% de la actividad coagulante de trombina a través de congelación/descongelación, y 102% a través de filtración de virus. El filtrado se formuló después en trometamol 10 mM, cloruro sódico 200 mM, cloruro cálcico 40 mM, sacarosa al 2%, mediante adición de un tampón adecuado. La solución se diluyó hasta una concentración de actividad coagulante de trombina estimada de 550 ui/ml con trometamol 10 mM, cloruro sódico 200 mM, cloruro cálcico 40 mM, sacarosa al 2%, pH 7,0, y luego se concentró con ácido clorhídrico 0,5 M hasta pH 7,0.

Esta solución se filtró luego a través de un filtro esterilizador de 0,2 μ m y luego se cargó en viales, 5g de solución por vial. Los viales se criodesecaron y luego se trataron con calor seco a 80°C durante 72 horas. Se produjo una recuperación medida del 97% de la actividad coagulante de trombina a través de la filtración esterilizante, 102% a través de liofilización y 100% a través de tratamiento con calor seco.

Ejemplo 15

Tiempos de incubación

Se diluyeron 150 ml de complejo de protrombina tratado con disolvente-detergente, con agua, hasta reducir la conductividad hasta aproximadamente 9,3 mS/cm. La solución se concentró luego hasta pH 8,0. Esta cantidad se cargó en cada una de cuatro columnas rellenas con 12,5-12,9 ml de DEAE Sefarosa CL6B, que se habían equilibrado con trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, pH 8,0. Las columnas se lavaron luego con el mismo tampón para eliminar los reactivos disolvente-detergente y la proteína débilmente unida. Las columnas se lavaron a continuación con trometamol 10 mM, cloruro sódico 110 mM, cloruro cálcico 2 mM, pH 8,0, las salidas de la columna se cerraron y las columnas se aislaron a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C), durante períodos entre 35 y 85 horas. Al final de cada período, una de las columnas se lavó con trometamol 10 mM, NaCl 110 mM, pH 8,0, para recuperar la trombina producida. Los resultados se muestran en la Tabla 11:

TABLA 11

Columna	Incubación (horas)	Actividad coagulante de trombina	
		Total recuperada, (ui)	Total >2000 ui/mg, (ui)
1	35	229.344	144.751
2	45	267.860	144.463
3	65	289.359	128.578
4	85	266.844	101.687

Hay una tendencia general a incrementar el rendimiento (unidades totales) pero reducir la pureza (unidades >2000 ui/mg) al incrementar el tiempo de incubación. Una persona experta puede elegir el tiempo de incubación para proporcionar el equilibrio más favorable entre el rendimiento total y la pureza en cualquier situación particular.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de trombina víricamente inactivada, que comprende las etapas de:

(a) inactivación vírica por disolvente-detergente de una solución que comprende protrombina y factor X;

(b) carga del producto de la etapa (a) en un medio de intercambio aniónico;

(c) lavado del medio para eliminar los reactivos usados para la inactivación vírica por disolvente-detergente en la etapa (a); y

(d) activación de la protrombina en el medio para formar trombina, mediante la adición de iones metálicos.

2. Un método según la reivindicación 1, en el que la solución que comprende protrombina y factor X, es un complejo de protrombina.

3. Un método para la preparación de trombina víricamente inactivada, que comprende las etapas de:

(a) inactivación vírica por disolvente-detergente de una solución que comprende factor X;

(b) carga del producto de la etapa (a) en un medio de intercambio aniónico;

(c) lavado del medio para eliminar los reactivos usados para la inactivación vírica por disolvente-detergente en la etapa (a);

(d) activación del factor X en el medio para formar factor Xa, mediante la adición de iones metálicos; y

(e) carga de protrombina víricamente inactivada en el medio de intercambio aniónico, de forma que se produzca trombina.

4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los iones metálicos son iones metálicos divalentes.

5. Un método según la reivindicación 4, en el que los iones metálicos divalentes son iones magnesio y/o calcio.

6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende adicionalmente la etapa de

(e) eluir selectivamente la trombina del medio de intercambio aniónico.

7. Un método según la reivindicación 6, que comprende adicionalmente las etapas de

(f) hacer pasar el producto de la etapa (e), a través de un filtro que retiene patógenos;

(g) añadir un ión metálico divalente y un carbohidrato al producto de la etapa (f), y

(h) criodesecar y termotratar el producto de la etapa (g) para inactivar virus.

8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las etapas (a) y (b) se reemplazan por las etapas (a') y (b'):

(a') cargar una solución que comprende protrombina y factor X en un medio de intercambio aniónico; y

(b') inactivación vírica por disolvente-detergente de la protrombina y factor X en el medio.