



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112015012854-8 B1**



**(22) Data do Depósito: 05/12/2013**

**(45) Data de Concessão: 30/11/2021**

**(54) Título:** MÉTODO PARA PURIFICAR PROTEÍNAS SELECIIONADAS DO GRUPO CONSISTINDO EM PLASMINOGÊNIO, ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO TECIDUAL E OUTRA(S) PROTEASE(S), SOLUÇÃO COMPREENDENDO FIBRINOGÊNIO E/OU FATOR VIII E/OU VWF, SEU USO E FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

**(51) Int.Cl.:** C07K 1/20; C07K 1/18; C07K 14/75; C07K 14/755; A61K 38/36; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 04/02/2013 EP 13153898.5; 05/12/2012 US 61/733,761; 10/04/2013 AU 2013203357; 14/03/2013 US 13/803,740.

**(73) Titular(es):** CSL BEHRING GMBH.

**(72) Inventor(es):** HUNG PHAM; JEFFREY MICHAEL HEY; DARREN NGUY.

**(86) Pedido PCT:** PCT AU2013001414 de 05/12/2013

**(87) Publicação PCT:** WO 2014/085861 de 12/06/2014

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 02/06/2015

**(57) Resumo:** MÉTODO PARA PURIFICAR PROTEÍNAS SELECIIONADAS DO GRUPO CONSISTINDO EM PLASMINOGÊNIO, ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO TECIDUAL E OUTRA(S) PROTEASE(S), SOLUÇÃO COMPREENDENDO FIBRINOGÊNIO E/OU FATOR VIII E/OU VWF, SEU USO E FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA. A presente invenção refere-se a um método para reduzir o nível de ao menos uma proteína selecionada de plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) em uma solução compreendendo pelo menos uma proteína dentre fibrinogênio, fator VIII e fator de von Willebrand (VWF). Também são fornecidas soluções e formulações farmacêuticas compreendendo o fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF recuperado por estes métodos, e seus usos.

**Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO PARA PURIFICAR PROTEÍNAS SELECIIONADAS DO GRUPO CONSISTINDO EM PLASMINOGÊNIO, ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO TECIDUAL E OUTRA(S) PROTEASE(S), SOLUÇÃO COMPREENDENDO FIBRINOGÊNIO E/OU FATOR VIII E/OU VWF, SEU USO E FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA".**

[0001] A presente invenção refere-se geralmente a um método para reduzir o nível de impurezas em uma solução contendo pelo menos uma proteína terapêutica e às soluções contendo a proteína terapêutica resultante. Mais especificamente, a um método para reduzir o nível de plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) em uma matéria-prima que compreende fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou fator de von Willebrand (VWF). A presente invenção também se refere geralmente às soluções e formulações farmacêuticas que compreende o fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF recuperados por estes métodos, e usos dos mesmos.

### **ANTECEDENTES**

[0002] Os métodos atuais para purificar uma proteína terapêutica de ocorrência natural ou recombinante a partir de uma solução que compreende a dita proteína geralmente transportam pelo menos algumas impurezas para a preparação final. Em alguns casos, a presença de impurezas, como proteases, irá desestabilizar a proteína terapêutica em solução, particularmente, durante o armazenamento. Por este motivo, muitas proteínas terapêuticas são armazenadas como preparações liofilizadas ou congeladas.

[0003] Embora níveis desestabilizantes de impurezas possam afetar muitos tipos diferentes de proteínas terapêuticas, eles são particularmente relevantes para aqueles usados para manter a hemostase. A hemostase é um processo fisiológico importante que impede o sangramento após lesão (por exemplo, uma ruptura) aos vasos san-

guíneos. Há três mecanismos básicos que promovem a hemostase: (i) vasoconstricção, (ii) agregação plaquetária no sítio de ruptura; e (iii) coagulação. Durante a coagulação, as células endoteliais danificadas liberam o fator tecidual (fator III), que, por sua vez, ativa o fator VII com

o auxílio de  $\text{Ca}^{2+}$ . O fator XII, que é liberado pelas plaquetas ativadas, ativa o fator XI. O fator VII e o fator XI ativados promovem uma cascata de reações enzimáticas que levam à ativação do fator X. O fator X ativo (fator Xa), junto com o fator III, fator V,  $\text{Ca}^{2+}$ , e fator tromboplástico das plaquetas ( $\text{PF}_3$ ), ativam o ativador de protrombina. O ativador de protrombina converte a protrombina em trombina, que converte o fibrinogênio (fator I) em fibrina, que forma uma rede inicial sobre o sítio de lesão. A rede inicial é então convertida em um coágulo de fibrina denso pelo fator XIII, fechando a ruptura até o local ser reparado. Durante a cascata da coagulação, a trombina também irá ativar o fator VIII, um pró-cofator de glicoproteína que, na circulação, é principalmente complexado ao fator de von Willebrand (VWF). O fator VIII interage com o fator IXa para ativar o fator X na presença de  $\text{Ca}^{+2}$  e fosfolipídios.

[0004] Uma deficiência no nível de qualquer uma ou mais das proteínas envolvidas na coagulação, inclusive o fibrinogênio, o fator VIII, e/ou o fator de von Willebrand (VWF), quer congênita ou adquirida, pode levar à coagulação insuficiente do sangue e ao risco de hemorragia. As opções de tratamento atuais são limitadas à administração de uma preparação farmacêutica de uma ou mais proteínas terapêuticas, de modo a restaurar os níveis endógenos das ditas proteínas e manutenção da hemostase. Entretanto, as preparações farmacêuticas existentes, que são tipicamente derivadas de plasma sanguíneo doado ou uma fonte recombinante, compreendem zimogênios e proteases (por exemplo, protrombina, plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual (tPA) e/ou outras proteases), que podem desestabilizar as proteínas terapêuticas, como fibrinogênio, fator VIII, ou VWF durante o armazenamento. Como uma consequência, estas preparações são relativamente instáveis em solução aquosa, com armazenamento em longo prazo limitado às preparações liofilizadas ou congeladas.

[0005] Para aplicações clínicas, o fibrinogênio é tipicamente purificado a partir do plasma humano, onde ele é responsável por apenas cerca de 2 a 5% (1,5 a 4,0 g/L) das proteínas totais do plasma. Tradicionalmente, a purificação do fibrinogênio do plasma é executada por fracionamento clássico do plasma, onde o fibrinogênio é crioprecipitado a partir do plasma seguido de precipitação com etanol, sulfato de amônio,  $\beta$  alanina/glicina, polímeros (por exemplo, polietileno glicol) ou soluções de baixa força iônica. Estes métodos podem obter alto rendimento relativo e homogeneidade. Quando um nível mais elevado de pureza é necessário, técnicas cromatográficas são frequentemente empregadas. Entretanto, as técnicas cromatográficas e de precipitação existentes, que são suscetíveis aos processos de fabricação em escala comercial, produzem, tipicamente, preparações de fibrinogênio que compreendem proteínas contaminantes como zimogênios ou proteases (por exemplo, protrombina, ativador do plasminogênio tecidual (tPA) e plasminogênio), que podem destabilizar o fibrinogênio em solução. Por exemplo, quando a protrombina está presente, ela pode ser ativada para a serina protease, trombina, que, por sua vez, irá converter o fibrinogênio em fibrina. De maneira similar, quando tanto o tPA quanto plasminogênio estão presentes, o tPA pode ativar o plasminogênio para sua forma ativa, plasmina, que irá, por sua vez, hidrolisar o fibrinogênio em fibrina. Como uma consequência, as preparações de fibrinogênio são relativamente instáveis em solução aquosa, com armazenamento em longo prazo limitado às preparações liofilizadas ou congeladas.

[0006] Contaminantes específicos podem ser absorvidos; por exemplo, fibronectina em gelatina imobilizada e plasminogênio em lisina imobilizada (Vuento *et al.* 1979, Biochem. J., 183(2):331-337). Entretanto, o uso de resinas de afinidade específicas não é suscetível aos processos em escala comercial de grande escala. Os motivos pa-

ra isto incluem o fato de que as resinas de afinidade em si não são suficientemente robustas para serem usadas repetidamente e, geralmente, adicionam tempo e custo de processamento significativos.

[0007] O documento EP1240200 (US6960463) é direcionado a métodos para purificar fibrinogênio a partir de uma solução contendo fibrinogênio usando cromatografia de troca iônica (IEX). Em particular, o método envolve aplicar uma solução contendo fibrinogênio a uma matriz de troca iônica sob condições que permitem ao fibrinogênio se ligar à matriz e, então, lavar a matriz de troca iônica com uma solução compreendendo pelo menos um ômega aminoácido. Isto é feito para promover a remoção diferencial de plasminogênio da resina. O fibrinogênio que está ligado à matriz é então eluído da matriz.

[0008] O documento WO2012038410 fornece um método para purificar fibrinogênio usando resinas de troca aniônica, que contêm um suporte de polímero hidroxilado enxertado com aminas terciárias ou quaternárias que se ligam ao fibrinogênio.

[0009] O documento EP1519944 ensina o uso de uma matriz de cromatografia por afinidade a íon metálico imobilizado sob condições nas quais o fibrinogênio e o plasminogênio se ligam à matriz, e o fibrinogênio e o plasminogênio são eluídos separadamente, de modo que a fração principal de fibrinogênio contenha cerca de 600 ng de plasminogênio por mg de proteína.

[0010] A presente invenção fornece um método para reduzir o nível de plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) em uma solução que compreende fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF. A(s) proteína(s) purificada(s) é/são estável(is) durante o armazenamento como preparações líquidas e pode(m) ser usada(s) para aplicações clínicas ou veterinárias, incluindo o tratamento ou prevenção de condições associadas com uma deficiência no nível da(s) dita(s) proteína(s).

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0011] Em um aspecto da presente invenção, é apresentado um método para reduzir o nível de ao menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) em uma solução compreendendo pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio, fator VIII e fator de von Willebrand (VWF), o método compreendendo:

(i) passar uma matéria-prima que compreende pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio, fator VIII e VWF através de uma resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica sob condições selecionadas para que pelo menos uma proteína, selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s), presente na matéria-prima seja ligada à resina; e

(ii) recuperar uma solução que compreende pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio, fator VIII e VWF, que passa através da resina, em que a concentração de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) na solução é reduzida em pelo menos 50% em comparação à matéria-prima.

[0012] Em outro aspecto da presente invenção, é apresentado um método para reduzir o nível de ao menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) em uma solução compreendendo pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio, fator VIII e fator de von Willebrand (VWF), o método compreendendo:

(i) passar uma matéria-prima que compreende pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio, fator

VIII e VWF através de uma resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica;

(ii) recuperar uma solução que compreende pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio, fator VIII e VWF, que passa através da primeira resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica;

(iii) passar a solução que é recuperada na etapa (ii) através de uma segunda resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica; e

(iv) recuperar a solução que compreende pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio, fator VIII e VWF, que passa através da segunda resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica;

em que as condições das etapas cromatográficas são tais que pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) presentes na matéria-prima é ligada à primeira e/ou à segunda resina, e em que a concentração de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) na solução que é recuperada na etapa (iv) é reduzida em pelo menos 50% em comparação à matéria-prima.

[0013] Em outro aspecto, é fornecida uma solução compreendendo pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio, fator VIII e VWF recuperado pelo método da presente invenção, conforme aqui descrita.

[0014] Em outro aspecto, é fornecido um frasco contendo pelo menos 5 mL de uma solução de fibrinogênio estável farmaceuticamente aceitável, em que a concentração de fibrinogênio é pelo menos 20 mg/mL.

[0015] Em outro aspecto, é fornecida uma formulação farmacêutica compreendendo uma solução compreendendo pelo menos uma proteína

ína selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio, fator VIII e VWF recuperado pelo método da presente invenção, conforme aqui descrito, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0016] Em outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma solução compreendendo:

- (a) pelo menos 75% de proteína total de fibrinogênio;
- (b) menos de 50 pg/mg de proteína total de ativador do plasminogênio tecidual; e/ou
- (c) menos de 1 mg/mg de proteína total de plasminogênio.

[0017] Em outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma solução compreendendo:

- (a) pelo menos 90% de proteína total de fibrinogênio;
- (b) menos de 50 pg/mg de proteína total de ativador do plasminogênio tecidual; e/ou
- (c) menos de 150 ng/mg de proteína total de plasminogênio.

[0018] Em outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma solução compreendendo:

- (a) pelo menos 90% de proteína total de fibrinogênio;
- (b) menos de 20 pg/mg de proteína total de ativador do plasminogênio tecidual; e/ou
- (c) menos de 10 ng/mg de proteína total de plasminogênio.

[0019] Em outro aspecto, é apresentado um método para tratar ou prevenir uma condição associada com deficiência de fibrinogênio, o método compreendendo a administração a um indivíduo que necessite da solução ou formulação farmacêutica da presente invenção, conforme aqui descrito.

[0020] Em outro aspecto, é fornecido o uso da solução da presente invenção, conforme aqui descrita, na fabricação de um medicamento para tratar ou prevenir uma condição associada com deficiência de fibrinogênio.

[0021] Em outro aspecto, é fornecida uma cola de fibrina compreendendo a solução da presente invenção, conforme aqui descrito.

[0022] Em outro aspecto, é apresentado um método de produzir uma solução de fibrinogênio líquida e estável, o método compreendendo:

(i) passar uma matéria-prima compreendendo fibrinogênio através de uma resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica sob condições selecionadas de modo que pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) presentes na matéria-prima é ligada à resina; e

(ii) recuperar uma solução compreendendo fibrinogênio, que passagens através da resina, em que a concentração de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) na solução é reduzida em pelo menos 50% em comparação com a matéria-prima.

[0023] Em outro aspecto, é apresentado um método de produzir uma solução de fibrinogênio líquida e estável, o método compreendendo:

(i) passar uma matéria-prima compreendendo fibrinogênio através de uma primeira resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica;

(ii) recuperar uma solução que compreende fibrinogênio que passa através da primeira resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica;

(iii) passar a solução que é recuperada na etapa (ii) através de uma segunda resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica; e

(iv) recuperar uma solução que compreende fibrinogênio que passa através da segunda resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica;

em que as condições das etapas cromatográficas são tais que pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) presente na matéria-prima é ligada à primeira e/ou à segunda resina, e em que a concentração de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) na solução que é recuperada na etapa (iv) é reduzida em pelo menos 50% em comparação à matéria-prima.

[0024] Em outro aspecto da presente invenção, é apresentado um método para purificar fibrinogênio, o método compreendendo as etapas de:

- (i) passar uma solução compreendendo fibrinogênio através de uma resina cromatográfica de troca iônica sob condições selecionadas para que o monômero de fibrinogênio seja ligado à resina;
- (ii) eluir o monômero de fibrinogênio da resina com um tampão de eluição; e
- (iii) filtrar o monômero de fibrinogênio eluído da etapa (ii) através de um filtro que tem um tamanho de poro na faixa de cerca de 15 nm a cerca de 35 nm.

### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0025] **A figura 1** mostra a porcentagem de recuperação de fibrinogênio, plasminogênio e t-PA de uma solução de fibrinogênio ao longo de um intervalo de níveis de pH, quando a solução é passada através de HEA Hypercel™ em modo negativo com relação ao fibrinogênio. As barras dentro de cada grupo representam (da esquerda para a direita): recuperação de fibrinogênio, recuperação de plasminogênio e recuperação de t-PA.

[0026] **A figura 2** mostra a porcentagem de recuperação de fibrinogênio, plasminogênio, t-PA, e fator II a partir de uma solução de fibrinogênio ao longo de um intervalo de níveis de pH, quando a solução

é passada através de PPA Hypercel™ em modo negativo com relação ao fibrinogênio. As barras dentro de cada grupo representam (da esquerda para a direita): recuperação de fibrinogênio, recuperação de plasminogênio, recuperação de t-PA e fator II.

[0027] **A figura 3** mostra a porcentagem de recuperação de fibrinogênio, plasminogênio, t-PA, e fator II a partir de uma solução de fibrinogênio ao longo de um intervalo de níveis de pH, quando a solução é passada através de MEP Hypercel™ em modo negativo com relação ao fibrinogênio. As barras dentro de cada grupo representam (da esquerda para a direita): recuperação de fibrinogênio, recuperação de plasminogênio, recuperação de t-PA e fator II.

[0028] **A figura 4a** mostra a porcentagem de recuperação de fibrinogênio, plasminogênio, t-PA e fator II de uma solução contendo fibrinogênio ao longo de um intervalo de níveis de pH, quando a solução é passada através de HEA Hypercel™ em modo negativo com relação ao fibrinogênio. As barras dentro de cada grupo representam (da esquerda para a direita): recuperação de fibrinogênio, recuperação de plasminogênio, recuperação de t-PA e recuperação de fator II.

[0029] **A figura 4b** mostra a estabilidade da solução contendo fibrinogênio recuperada da gota através da fração da coluna HEA Hypercel™ (figura 4a) ao longo de 6 dias à temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), conforme medido pelo % de proteína coagulável inicial. As barras dentro de cada grupo representam (da esquerda para a direita): T = 1 dia, T = 3 dias, T = 6 dias.

[0030] **A figura 4c** mostra a estabilidade da solução contendo fibrinogênio recuperada da gota através da fração da coluna HEA Hypercel™ (figura 4a) ao longo de 6 dias à temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), conforme medido pelo % de proteína coagulável. As barras dentro de cada grupo representam (da esquerda para a direita): T = 1, T = 3 dias, T = 6 dias.

[0031] **A figura 5** mostra a porcentagem de recuperação do processo para fibrinogênio, t-PA, plasminogênio e fator II em frações derivadas de um método de acordo com uma modalidade da presente invenção, a partir do crioprecipitado do plasma através do produto eluído em MacroPrep<sup>TM</sup>-HQ. As barras dentro de cada grupo representam (da esquerda para a direita): fibrinogênio, fibronectina, plasminogênio, t-PA e fator II.

[0032] **A figura 6** mostra a pureza do fibrinogênio monomérico que foi recuperado da resina cromatográfica MacroPrep<sup>TM</sup>-HQ, conforme medido por um cromatograma de HPLC de exclusão de tamanho analítica.

[0033] **A figura 7** mostra a capacidade de filtração do fibrinogênio recuperado da resina cromatográfica MacroPrep<sup>TM</sup>-HQ usando tampões de eluição com diferentes condutividades (NaCl 190mM, 21,5 mS/cm (losangos); NaCl 200mM, 22,5 mS/cm (quadrados); NaCl 210mM, 23,5 mS/cm (triângulos); 1% (p/p) de arginina/NaCl 200mM, 25 mS/cm (cruz)).

[0034] **A figura 8** mostra a atividade do fibrinogênio como uma porcentagem da atividade inicial de fibrinogênio a t=0 de fibrinogênio líquido recuperado da resina cromatográfica MacroPrep<sup>TM</sup>-HQ que é armazenada a 2 a 8°C (losangos) durante um período de 9 semanas ou 30°C (quadrados) durante um período de 7 semanas.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA**

[0035] Ao longo do relatório descritivo, a menos que o contexto exija de outro modo, a palavra "compreendem" ou variações como "compreende" ou "compreendendo" deverão ser compreendidas para implicar a inclusão de um elemento ou número inteiro ou grupo de elementos ou números inteiros indicados, mas não a exclusão de qualquer outro elemento ou número inteiro ou grupo de elementos ou números inteiros.

[0036] A referência neste relatório descritivo a qualquer publicação anterior (ou informações derivadas dela), ou a qualquer matéria conhecida, não é, e não deve ser considerada um reconhecimento ou admissão ou qualquer forma de sugestão de que esta publicação anterior (ou informações derivadas dela) ou matéria conhecida faz parte do conhecimento geral comum no campo de trabalho ao qual este relatório descritivo se refere.

[0037] Deve ser observado que, conforme usado no presente relatório descritivo, as formas no singular "o," "a", "um", "uma" incluem referências no plural a menos que o contexto claramente determine de outro modo. Desta forma, por exemplo, referência a "uma formulação" inclui uma única formulação, assim como duas ou mais formulações.

[0038] Na ausência de qualquer indicação em contrário, referência feita a um teor "%" ao longo deste relatório descritivo deve ser tida como significando % p/p (peso/peso). Por exemplo, uma solução compreendendo pelo menos 80% de proteína total de fibrinogênio significa uma solução compreendendo fibrinogênio a uma concentração de pelo menos 80% p/p de proteína total. Isto pode ser calculado, por exemplo, pela divisão da quantidade de fibrinogênio derivada do ensaio de proteína coagulável pela quantidade de proteína total derivada de um ensaio de proteína padrão (por exemplo, Biuret) e multiplicação por 100. No ensaio de proteína coagulável, a trombina é adicionada a uma tomar amostras para formar um coágulo, que é quase todo de fibrina. O coágulo pode ser separado do sobrenadante contendo proteínas não coaguláveis por centrifugação. Subsequentemente, o coágulo é lavado e dissolvido por ureia alcalina ou outras substâncias e a concentração de proteína é determinada por espectrofotometria. Uma vez que a maior parte do coágulo é de fibrina, a concentração de proteína será equivalente à concentração de fibrinogênio. Portanto, a quantidade de proteína coagulável em uma amostra é equivalente à diferença

entre a proteína total e o componente de proteína não coagulável da amostra.

[0039] A purificação de fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF de uma matéria-prima (por exemplo, plasma ou sobrenadante de cultura celular) é tipicamente executada por fracionamento convencional, onde o fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF é precipitado da solução usando, por exemplo, etanol, sulfato de amônio,  $\beta$  alanina/glicina, polímeros (por exemplo, polietileno glicol) e/ou soluções de baixa força iônica. Os métodos de purificação de plasma atuais que empregam diferentes etapas cromatográficas podem alcançar alto rendimento relativo e preparações homogêneas de uma proteína de interesse. Entretanto, estes métodos resultam, tipicamente, em preparações compreendendo quantidades residuais de impurezas que podem não ser adequadas para a formulação de uma preparação líquida estável para aplicações clínicas. Impurezas como protrombina, ativador do plasminogênio tecidual (tPA) e plasminogênio são particularmente problemáticas, uma vez que níveis desestabilizantes destas impurezas podem hidrolisar o fibrinogênio em solução aquosa, tornando, então, o fibrinogênio instável, particularmente durante a fabricação e/ou armazenamento em longo prazo.

[0040] A presente invenção se baseia, pelo menos em parte, no achado de que passar uma matéria-prima compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF através de uma resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica (HCIC) e recuperar a solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF que passa através da resina é uma alternativa eficaz aos processos de purificação existentes para reduzir o nível desestabilizante de plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) na solução.

[0041] Desta forma, em um aspecto da presente invenção, é apresentado um método para reduzir o nível de ao menos uma proteína

selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) em uma solução compreendendo pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio, fator VIII e fator de von Willebrand (VWF), o método compreendendo:

(i) passar uma matéria-prima que compreende pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio, fator VIII e VWF através de uma resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica sob condições selecionadas para que pelo menos uma proteína, selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s), presente na matéria-prima seja ligada à resina; e

(ii) recuperar uma solução que compreende pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio, fator VIII e VWF, que passa através da resina, em que a concentração de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) na solução é reduzida em pelo menos 50% em comparação à matéria-prima.

[0042] Em uma modalidade, a concentração do plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) na solução recuperada compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF é reduzida em pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, ou pelo menos 90% ou pelo menos 95% ou pelo menos 98% em comparação à matéria-prima.

[0043] Em outro aspecto, é apresentado um método de produzir uma solução de fibrinogênio líquida e estável, o método compreendendo:

(i) passar uma matéria-prima compreendendo fibrinogênio através de uma resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica

sob condições selecionadas de modo que pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) presentes na matéria-prima é ligada à resina; e

(ii) recuperar uma solução compreendendo fibrinogênio, que passagens através da resina, em que a concentração de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) na solução é reduzida em pelo menos 50% em comparação com a matéria-prima.

[0044] Em uma modalidade, a concentração do plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) na solução recuperada compreendendo fibrinogênio é reduzida em pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, ou pelo menos 90% ou pelo menos 95% ou pelo menos 98% em comparação à matéria-prima.

[0045] Os processos cromatográficos empregam, tipicamente, um suporte sólido, também chamado de forma intercambiável na presente invenção de resina ou matriz. Os suportes sólidos adequados seriam familiares aos versados na técnica. Exemplos incluem veículos inorgânicos, como vidro e gel de sílica, veículos orgânicos, sintéticos ou de ocorrência natural, como agarose, celulose, dextrano, poliamida, poliacrilamidas, copolímeros de vinila de acrilatos bifuncionais, e vários monômeros hidroxilados, e similares. Os veículos comercialmente disponíveis são vendidos com os nomes de resinas Sephadex<sup>TM</sup>, Sepharose<sup>TM</sup>, Hypercel<sup>TM</sup>, Capto<sup>TM</sup>, Fractogel<sup>TM</sup>, MacroPrep<sup>TM</sup>, Unosphere<sup>TM</sup>, GigaCap<sup>TM</sup>, Trisacryl<sup>TM</sup>, Ultrogel<sup>TM</sup>, Dynospheres<sup>TM</sup>, Macrosorb<sup>TM</sup> e XAD<sup>TM</sup>.

[0046] As etapas de cromatografia serão geralmente executadas sob condições não desnaturantes e a temperaturas convenientes na faixa de cerca de 10°C a 30°C, mais geralmente a cerca de temperatu-

ras ambientes. As etapas cromatográficas podem ser feitas por lote ou continuamente, conforme for conveniente. Qualquer método conveniente de separação pode ser empregado, como coluna, centrifugação, filtração, decantação, ou similares.

[0047] A cromatografia de indução de carga hidrofóbica (HCIC) que também é frequentemente chamada de modo misto, ou cromatografia multimodal, será familiar aos versados na técnica. A HCIC usa porções de ligação fixadas a um suporte sólido, sendo que as porções de ligação podem ter especificidade para uma ou mais proteínas que, de acordo com os métodos da presente invenção, representam impurezas na matéria-prima (por exemplo, zimogênios e proteases, como protrombina, tPA e plasminogênio).

[0048] Qualquer resina de HCIC adequada conhecida dos versados na técnica pode ser usada. Em uma modalidade, a resina de HCIC compreende um ligante selecionado do grupo que consiste em mercaptoetilpiridina (4-mercaptopropilpiridina, por exemplo, MEP Hypercel<sup>TM</sup>), n-hexilamina (por exemplo, HEA Hypercel<sup>TM</sup>) e fenilpropilamina (por exemplo, PPA Hypercel<sup>TM</sup>). Em uma modalidade, a resina de HCIC compreende n-hexilamina.

[0049] Os ligantes de HCIC como HEA, MEP e PPA têm uma vantagem de que eles permitem a separação com base na hidrofobicidade de superfície das proteínas, mas não exigem a adição de sais liotrópicos frequentemente vistos em outros processos para a purificação do fibrinogênio usando cromatografia hidrofóbica (por exemplo, cromatografia de interação hidrofóbica; HIC). Ao contrário da cromatografia de interação hidrofóbica tradicional, a HCIC é controlada com base no pH, ao invés da concentração de sal. As resinas de HCIC também fornecem alta capacidade de ligação e altas taxas de fluxo, ideais para purificação em escala laboratorial e industrial.

[0050] As resinas de HCIC são frequentemente empacotadas em

colunas com alturas de leito de cerca de 2 cm a cerca de 40 cm. Em escala industrial, as alturas dos leitos são geralmente de pelo menos 10 cm e estão tipicamente na faixa de cerca de 15 cm a 25 cm. Os diâmetros de coluna das colunas industriais podem situar-se na faixa de 20 cm até cerca de 1,5m. Estas colunas são operadas a taxas de fluxo de acordo com as instruções de fabricação da resina de HCIC com taxas de fluxo no intervalo típico de 50 a 100 cm/h. A limitação superior da taxa de fluxo é em parte, causada pelas restrições de pressão da resina de HCIC. Para a resina de HEA, por exemplo, o limite superior de pressão de operação é < 3 bar (< 300 kPa). As capacidades de ligação dinâmica típicas (10% de penetração de uma proteína de ligação) para resinas de HCIC são de cerca de 20 a 30 mg de proteína ligada por mL de resina. Para a presente invenção, isto permite que quantidades relativas grandes de proteína sejam carregadas na coluna de HCIC já que as proteínas abundantes, como fibrinogênio, podem passar através da coluna, enquanto proteínas menos abundantes, como plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) se ligam à resina de HCIC. Isto é vantajoso para fabricação em escala industrial já que colunas com menor tamanho e/ou menos ciclos de coluna são necessários para o processamento de um lote.

[0051] Os presentes inventores observaram que o pH da solução ou matéria-prima compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF que é passada através da resina de HCIC de acordo com os métodos da presente invenção pode ser ajustado para controlar a recuperação do fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF e a remoção de impurezas. Desta forma, em uma modalidade aqui apresentada, a solução ou matéria-prima compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF que é passada através da resina de HCIC tem um pH de cerca de 6,0 a cerca de 9,5. Em modalidades particulares, a solução ou matéria-prima

compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF é passada através da resina de HCIC, de preferência, a um pH de cerca de 4,0; 5,0; 5,25; 5,5; 5,75; 6,0; 6,25; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 7,75; 8,0; 8,25; 8,5; 8,75; 9,0; 9,25; 9,5 ou 10,0. Em uma modalidade particular, a solução ou matéria-prima compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF que é passada através da resina de HCIC tem um pH de cerca de 7,0. Em modalidades particulares, a resina de HCIC é equilibrada antes do carregamento da solução ou matéria-prima a um pH de cerca de 4,0; 5,0; 5,25; 5,5; 5,75; 6,0; 6,25; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 7,75; 8,0; 8,25; 8,5; 8,75; 9,0; 9,25; 9,5 ou 10,0.

[0052] O método da presente invenção pode, também, empregar o uso de mais de uma etapa de cromatografia adicional para remover impurezas adicionais, se necessário, e desta forma, aprimorar a pureza da preparação final. Etapas de purificação cromatográfica adicionais podem ser implementadas antes ou após a purificação do fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF através da resina de HCIC de acordo com a presente invenção. Por exemplo, a solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF que é recuperada da resina de HCIC na etapa (ii) pode ser passada através de uma outra resina cromatográfica.

[0053] As etapas de purificação cromatográfica adicionais podem empregar uma outra resina de HCIC. Desta forma, em outro aspecto da presente invenção, é apresentado um método para reduzir o nível de ao menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) em uma solução compreendendo pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio, fator VIII e fator de von Willebrand (VWF), o método compreendendo:

(i) passar uma matéria-prima que compreende pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio, fator

VIII e VWF através de uma resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica;

(ii) recuperar uma solução que compreende pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio, fator VIII e VWF, que passa através da primeira resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica;

(iii) passar a solução que é recuperada na etapa (ii) através de uma segunda resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica; e

(iv) recuperar a solução que compreende pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio, fator VIII e VWF, que passa através da segunda resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica;

em que as condições das etapas cromatográficas são tais que pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) presente na matéria-prima é ligada à primeira e/ou à segunda resina, e em que a concentração de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) na solução que é recuperada na etapa (iv) é reduzida em pelo menos 50% em comparação à matéria-prima.

[0054] Em uma modalidade, a concentração do plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) na solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF que é recuperada na etapa (iv) é reduzida em pelo menos 60%, em pelo menos 70%, em pelo menos 80%, ou em pelo menos 90% ou em pelo menos 95% ou em pelo menos 98% em comparação com a matéria-prima.

[0055] Em outro aspecto, é apresentado um método de produzir uma solução de fibrinogênio líquida e estável, o método compreendendo:

- (i) passar uma matéria-prima compreendendo fibrinogênio através de uma primeira resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica;
- (ii) recuperar uma solução que compreende fibrinogênio que passa através da primeira resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica;
- (iii) passar a solução que é recuperada na etapa (ii) através de uma segunda resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica; e
- (iv) recuperar uma solução que compreende fibrinogênio que passa através da segunda resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica;

em que as condições das etapas cromatográficas são tais que pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) presente na matéria-prima é ligada à primeira e/ou à segunda resina, e em que a concentração de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) na solução que é recuperada na etapa (iv) é reduzida em pelo menos 50% em comparação à matéria-prima.

[0056] Em uma modalidade, a concentração do plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) na solução compreendendo fibrinogênio que é recuperada na etapa (iv) é reduzida em pelo menos 60%, em pelo menos 70%, em pelo menos 80%, ou em pelo menos 90% ou em pelo menos 95% ou em pelo menos 98% em comparação com a matéria-prima.

[0057] Em uma modalidade aqui apresentada, a segunda resina de HCIC é diferente da primeira resina de HCIC. Em outra modalidade aqui apresentada, a primeira e a segunda resinas cromatográficas de indução de carga hidrofóbica são iguais. Quando a solução que compreende fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF que é recuperada da re-

sina de HCIC na etapa (ii) é passada através da mesma resina de HCIC, pode ser desejável lavar a resina de HCIC após a etapa (ii) e antes de passar a solução recuperada através da resina de HCIC na etapa (iii) novamente, de modo a remover quaisquer impurezas que podem estar ligadas à resina.

[0058] A resina cromatográfica adicional pode, também, ser uma resina cromatográfica de troca de ânion. Em cromatografia de troca de ânion, moléculas negativamente carregadas são atraídas para um suporte sólido carregado positivamente. Um suporte sólido carregado positivamente pode ser preparado por quaisquer meios conhecidos dos versados na técnica e geralmente envolverá a ligação covalente de um ligante funcional carregado negativamente sobre um suporte sólido. Os ligantes funcionais carregados negativamente adequados dependerão invariavelmente da molécula a ser separada da solução. Exemplos de resinas de troca aniônica adequadas são aquelas compreendendo um grupo de amina quaternária funcional (Q) e/ou um grupo de amina terciária (DEAE), ou um grupo de dietilaminopropila (ANX). As matrizes de cromatografia de troca de ânion comercialmente disponíveis incluem, mas não se limitam a, DEAE celulose, Poros<sup>TM</sup> PI 20, PI 50, HQ 10, HQ 20, HQ 50, D 50 obtidas junto à Applied Biosystems, MonoQ<sup>TM</sup>, MiniQ<sup>TM</sup>, Source<sup>TM</sup> 15Q e 30Q, Q, DEAE e ANX Sepharose Fast Flow<sup>TM</sup>, Q Sepharose high Performance<sup>TM</sup>, QAE SEPHADEX<sup>TM</sup> e FAST Q SEPHAROSE<sup>TM</sup> obtidas junto à GE Healthcare, WP PEI<sup>TM</sup>, WP DEAM<sup>TM</sup>, WP QUAT<sup>TM</sup> obtidas junto à J.T. Baker, Hydrocell<sup>TM</sup> DEAE e Hydrocell<sup>TM</sup> QA obtidas junto à Biochrom Labs Inc., UNOsphere<sup>TM</sup> Q, Macro-Prep<sup>TM</sup> DEAE e Macro-Prep<sup>TM</sup> High Q obtidas junto à Biorad, Ceramic HyperD<sup>TM</sup> Q, Ceramic HyperD<sup>TM</sup> DEAE, Q HyperZ<sup>TM</sup>, Trisacryl<sup>TM</sup> M e LS<sup>TM</sup> DEAE, Spherodex<sup>TM</sup> LS DEAE, QMA Spherosil<sup>TM</sup> LS, QMA Spherosil<sup>TM</sup> M obtidas junto à Pall Technologies, matriz aniônica de base forte e rede fina DOWEX<sup>TM</sup> tipo

I e tipo II e ânion de base fraca DOWEX™ MONOSPHER E 77 obtidas junto à Dow Liquid Separations, Matrex Cellufine™ A200, A500, Q500, e Q800, obtidas junto à Millipore, Fractogel™ EMD TMAE<sub>3</sub> Fractogel™ EMD DEAE e Fractogel™ EMD DMAE obtidas junto à EMD, trocadores de ânions fracos e fortes Amberlite™ tipos I e II, trocadores de ânions fracos e fortes DOWEX™ tipos I e II, trocadores de ânions fracos e fortes Diaion™ tipos I e II, Duolite™ obtidos junto à Sigma- Aldrich, TSK™ gel Q e DEAE 5PW e 5PW-HR, Toyopearl™ SuperQ- 650S, 650M e 650C<sub>3</sub> QAE-- 26 - 550C e 650S, DEAE- 650M e 650C obtidas junto à Tosoh, e QA52™, DE23™, DE32™, DE51™, DE52™, DE53™, Express-Ion™ D e Express-Ion™ Q obtidas junto à Whatman.

[0059] Se desejável, uma membrana de cromatografia de troca de ânion pode ser usada ao invés de uma matriz de cromatografia de troca de ânion. As membranas de troca de ânion comercialmente disponíveis incluem, mas não se limitam a, Sartobind™ Q obtida junto à Sartorius, Mustang™ Q obtida junto à Pall Technologies e membrana Intercept™ Q obtida junto à Millipore.

[0060] Em uma modalidade aqui apresentada, a resina de troca de ânions é uma resina de troca de ânions forte. Em outra modalidade aqui apresentada, a resina de troca de ânions forte compreende um ligante funcional de amina quaternária (por exemplo, -N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> conforme visto, por exemplo, em MacroPrep™-HQ; Bio-Rad Laboratories). Em ainda outra modalidade, a resina de troca de ânions é grupos de trimetilamina enxertados a um polímero metacrílico hidroxilado através de um grupo de ligação como GigaCap Q-650M®.

[0061] Em uma modalidade, a cromatografia de troca de ânion é feita em modo positivo com relação ao fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF. Ou seja, as condições usadas são tais que, quando a solução ou matéria-prima compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF é passada através da resina cromatográfica de troca de ânion, o fibri-

nogênio e/ou fator VIII e/ou VWF se liga aos grupos funcionais carregados positivamente ligados à resina, permitindo que impurezas na solução passem através da resina na fração do fluxo de passagem ("escoamento (drop-through"), onde elas podem ser descartadas ou recuperadas para outros propósitos. Quando a fração de escoamento passa através da resina, a resina cromatográfica de troca de ânions pode ser lavada com um tampão de lavagem adequado conhecido dos versados na técnica. Os constituintes do tampão de lavagem e as condições da etapa de lavagem serão tipicamente selecionados para reter o fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF ligado à resina durante a etapa de lavagem. O versado na técnica também reconhecerá que referência ao tampão de lavagem, tampão de eluição ou similar em relação à cromatografia pode incluir soluções que têm pouca ou nenhuma capacidade de tamponamento.

[0062] Em uma modalidade aqui apresentada, antes de eluir o fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF da resina cromatográfica de troca de ânion, a resina é lavada com uma solução de lavagem que compreende ácido  $\epsilon$ -psilon-aminocaproico ( $\epsilon$ -ACA). A adição de  $\epsilon$ -ACA ao tampão de lavagem pode promover a eluição de proteases (como plasminogênio) que podem ser ligadas à resina cromatográfica de troca de ânions durante a primeira passagem. Um exemplo de uma etapa de lavagem adequada é descrita na Patente US 6.960.463.

[0063] Para eluir o fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF que permanece ligado à resina cromatográfica de troca de ânion, qualquer tampão de eluição adequado conhecido dos versados na técnica pode ser usado. Para a remoção de plasminogênio e/ou t-PA e/ou outra(s) protease(s) de uma solução compreendendo fibrinogênio, os presentes inventores observaram que um tampão de eluição compreendendo de cerca de 150mM a cerca de 300mM de NaCl permite aos monômeros de fibrinogênio serem eluídos da resina de troca de ânion, enquan-

to minimizam a eluição dos agregados de fibrinogênio e/ou outras proteínas (por exemplo, fator VIII, VWF, fibronectina ou proteases) que também podem estar ligados à resina. Desta forma, em uma modalidade aqui apresentada, o fibrinogênio é eluído da resina de troca de ânions com um tampão de eluição que compreende de cerca de 150mM a cerca de 300mM de NaCl. Isto corresponde a um tampão de eluição tendo um intervalo de condutividade de cerca de 18mS/cm (NaCl 150 mM) a cerca de 32mS/cm (NaCl 300 mM).

[0064] Em outra modalidade, o fibrinogênio é eluído da resina de troca de ânions com um tampão de eluição que compreende de cerca de 150 mM a cerca de 270 mM de NaCl. Isto corresponde a um tampão de eluição tendo um intervalo de condutividade de cerca de 18 mS/cm (NaCl 150mM) a cerca de 29 mS/cm (NaCl 270 mM).

[0065] Em outra modalidade, o fibrinogênio é eluído da resina de troca de ânions com um tampão de eluição que compreende de cerca de 170 mM a cerca de 230 mM de NaCl. Isto corresponde a um tampão de eluição tendo um intervalo de condutividade de cerca de 19 mS/cm (NaCl 170 mM) a cerca de 25 mS/cm (NaCl 230 mM).

[0066] Em outra modalidade, o fibrinogênio é eluído da resina de troca de ânions com um tampão de eluição que compreende de cerca de 200 mM a cerca de 220 mM de NaCl. Isto corresponde a um tampão de eluição tendo um intervalo de condutividade de cerca de 22 mS/cm (NaCl 200 mM) a cerca de 24 mS/cm (NaCl 220 mM).

[0067] Em outra modalidade, o fibrinogênio é eluído da resina de troca de ânions com um tampão de eluição que compreende de cerca de 190 mM a cerca de 210 mM de NaCl.

[0068] Em outra modalidade, o fibrinogênio é eluído da resina de troca de ânions com um tampão de eluição que compreende de cerca de 150 mM a cerca de 190 mM de NaCl.

[0069] Em outra modalidade, o tampão de eluição tem uma condu-

tividade na faixa de 18 a 32 mS/cm; ou 20 a 25 mS/cm; ou 21 a 23,5 mS/cm; ou 22 a 23 mS/cm. Em uma modalidade preferencial, a condutividade do tampão de eluição é de cerca de 22,5 mS/cm.

[0070] Em uma modalidade aqui apresentada, o tampão de eluição compreende um aminoácido livre em uma concentração que promove a eluição do monômero de fibrinogênio em seus agregados. Em outra modalidade, o tampão de eluição compreende um aminoácido livre a uma concentração de cerca de 0,5 a 10 % (p/p). Qualquer aminoácido livre adequado pode ser usado nesta capacidade. Em uma modalidade, o aminoácido livre é arginina. Em outra modalidade, o tampão de eluição compreende arginina na faixa de cerca de 4 a cerca de 10% (p/p).

[0071] Em outras modalidades, o tampão de eluição compreende NaCl 200mM, 0,5% (p/p) de arginina; ou NaCl 160mM, 1% (p/p) de arginina.

[0072] Em uma modalidade, a cromatografia de troca de ânion é feita em modo negativo com relação ao fibrinogênio e modo positivo com relação ao fator VIII e/ou VWF. Ou seja, as condições usadas são tais que quando a solução, ou matéria-prima compreendendo fibrinogênio e fator VIII e/ou VWF, é passada através da resina cromatográfica de troca de ânion, o fator VIII e/ou VWF se liga aos grupos funcionais carregados positivamente ligados à resina, permitindo ao fibrinogênio na solução passar através da resina na fração do fluxo de passagem ("escoamento"). Quando a fração de fluxo de passagem contendo fibrinogênio passa através da resina, a resina cromatográfica de troca de ânions pode ser lavada com um tampão de lavagem adequado conhecido dos versados na técnica. Os constituintes do tampão de lavagem e as condições da etapa de lavagem serão tipicamente selecionados para reter o fator VIII e/ou VWF ligado à resina durante a etapa de lavagem.

[0073] Em uma modalidade, a solução ou matéria-prima compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF é passada através da resina cromatográfica de troca de ânions na presença de cerca de 150mM a cerca de 270mM de NaCl. Isto corresponde a um intervalo de condutividade de cerca de 18mS/cm (NaCl 150mM) a cerca de 29mS/cm (NaCl 270mM). Sob estas condições, o fibrinogênio, particularmente a forma monomérica, passa através da resina cromatográfica de troca de ânions enquanto os agregados contendo fibrinogênio e outras impurezas como IgG e fibronectina se ligam à resina. Em modalidades adicionais, a solução ou matéria-prima compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF é passada através da resina cromatográfica de troca de ânions na presença de cerca de 170mM a cerca de 230mM de NaCl (cerca de 19 mS/cm a cerca de 25 mS/cm) ou cerca de 200mM a cerca de 220mM de NaCl (cerca de 22 mS/cm a cerca de 24 mS/cm). Sob estes tipos de condições, espera-se que o fator VIII e/ou vWF se liguem à resina cromatográfica de troca de ânion.

[0074] O fator VIII e/ou VWF podem ser eluídos da resina de troca de ânions com um tampão de eluição compreendendo pelo menos 300mM de um sal como NaCl. Em uma modalidade particular, o fator VIII e/ou VWF são eluídos da resina de troca de ânions com cerca de 500 mM de NaCl. Quando o fibrinogênio e fator VIII e/ou VWF são ligados à resina de troca de ânion, a etapa de eluição pode ser conduzida de modo que o fibrinogênio seja inicialmente eluído (por exemplo, usando as condições mostradas nas modalidades acima) e, então, o fator VIII e/ou VWF podem ser eluídos usando uma concentração mais elevada de sal, tal como NaCl 500mM.

[0075] Quando uma etapa de cromatografia de troca de ânion é empregada, ela pode ser feita antes e/ou depois de passar a matéria-prima compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF através da resina de HCIC. Em uma modalidade aqui apresentada, o método

compreende adicionalmente passar a solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF que é recuperada na etapa (ii) através de uma resina cromatográfica de troca de ânion. Em outra modalidade, quando a primeira e a segunda etapas cromatográficas de HCIC são empregadas, conforme aqui descrito, o método compreende, ainda, passar a solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF que é recuperada na etapa (ii) e/ou etapa (iv) através de uma resina cromatográfica de troca de ânion.

[0076] Em uma modalidade aqui apresentada, o método compreende, adicionalmente, passar a matéria-prima compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF através de uma resina cromatográfica de troca de ânions antes da etapa (i).

[0077] Os versados na técnica irão compreender que o número de etapas cromatográficas adicionais usadas de acordo com a presente invenção dependerá do nível de pureza necessário na preparação final. Por exemplo, o método da presente invenção pode compreender 2, 3, 4 ou 5 etapas de cromatografia, conforme descrito aqui. Por exemplo, quando o método compreende 2 etapas de cromatografia, a sequência de etapas será HCIC/IEX ou HCIC/HCIC ou IEX/HCIC; quando o método compreende 3 etapas de cromatografia, a sequência de etapas será HCIC/IEX/HCIC ou HCIC/HCIC/IEX ou HCIC/HCIC/HCIC ou HCIC/IEX/IEX ou IEX/HCIC/HCIC ou IEX/HCIC/IEX ou IEX/IEX/HCIC; quando o método compreende 4 etapas de cromatografia, a sequência de etapas será HCIC/IEX/HCIC/HCIC ou HCIC/HCIC/IEX/HCIC ou HCIC/HCIC/HCIC/IEX ou HCIC/IEX/IEX/HCIC ou HCIC/IEX/IEX/IEX ou HCIC/HCIC/IEX/IEX ou HCIC/HCIC/HCIC/IEX ou IEX/HCIC/HCIC/IEX ou IEX/HCIC/HCIC/IEX ou IEX/HCIC/HCIC/IEX ou IEX/IEX/IEX/HCIC; e assim por diante (quando

“IEX” denota cromatografia de troca de ânion). O nível de pureza necessário pode ser ditado pelo uso pretendido da solução (por exemplo, para o tratamento de pacientes com uma deficiência de fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF) e/ou quando um período de armazenamento mais longo é necessário como uma preparação aquosa.

[0078] A cromatografia pode ser feita usando quaisquer meios conhecidos dos versados na técnica. Por exemplo, as etapas de cromatografia de acordo com a presente invenção podem usar colunas de fluxo axial, como aquelas disponíveis junto à GE Healthcare, Pall Corporation e Bio-Rad, ou colunas de fluxo radial, como aquelas disponíveis junto à Proxcys. As etapas de cromatografia de acordo com a presente invenção também podem ser conduzidas usando tecnologias de leito expandido.

[0079] Em uma modalidade, a concentração do plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) na solução recuperada compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF é reduzida em pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, ou pelo menos 90% ou pelo menos 95% em comparação à matéria-prima.

[0080] Os métodos que aumentam a remoção de impurezas, como plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) são particularmente vantajosos, porque a estabilidade e a eficácia do fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF em solução é decisivamente aprimorada, particularmente durante armazenamento em longo prazo. O armazenamento sob a forma líquida é particularmente vantajoso para soluções compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF porque o uso imediato em um paciente é possível. Isto é ao contrário do uso de preparações liofilizadas de fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF purificado, que exigem reconstituição da(s) proteína(s) liofilizada(s) em um tampão adequado e/ou água para injeção imedia-

tamente antes da administração a um indivíduo que necessite.

[0081] Uma vantagem da depleção de proteases ou seus zimogênicos (como plasminogênio) de uma solução que compreende fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF é que isto reduz a necessidade de adicionar agentes anti-fibrinolíticos para inibir qualquer protease e/ou zimogênio residual (por exemplo, plasmina ou plasminogênio). Exemplos destes agentes incluem aprotinina, um inibidor de proteína bovina da plasmina; ácido ortranexâmico, um inibidor sintético da plasmina também associado com efeitos colaterais neurotóxicos.

[0082] Uma característica vantajosa adicional é que o plasminogênio, que foi separado da solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF por HCIC, pode ser adicionalmente processado para produzir um concentrado contendo plasminogênio para, por exemplo, uso clínico. A HCIC pode, portanto, ser usada para preparar plasminogênio e soluções compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF a partir de uma única solução inicial.

[0083] Uma característica vantajosa adicional é que os custos de produção da resina de HCIC são muito mais econômicos do que o custo da resina lisina-Sepharose<sup>TM</sup> ou resina com lisina imobilizada que são usadas em procedimentos de cromatografia de afinidade.

[0084] Uma característica vantajosa adicional é que a HCIC poderia ser usada para substituir as etapas com hidróxido de alumínio (por exemplo, Alhydrogel<sup>TM</sup>) para a remoção de proteases (por exemplo, fator II). Alhydrogel<sup>TM</sup> é atualmente amplamente usado na produção comercial de fator VIII e VWF. O material é, entretanto, relativamente caro, com 100 kg tipicamente usados por lote. Além disso, o Alhydrogel<sup>TM</sup> frequentemente exige manuseio manual e o material é descartado após um único uso. Em contrapartida, as etapas de HCIC podem ser completamente automatizadas e a resina pode ser usada na fabricação de múltiplos lotes.

[0085] Uma outra característica vantajosa é que a resina de HCIC é compatível com NaOH 1M, que pode ser usado para inativação e remoção de patógenos, incluindo vírus e príons durante os procedimentos de limpeza da coluna e sanitização da resina.

[0086] As preparações líquidas derivadas dos métodos da presente invenção também têm vantagens em relação ao uso de preparações congeladas, que exigem meios caros de armazenamento e transporte e devem ser descongeladas antes do uso imediato. Mesmo quando o fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF é armazenado como uma preparação liofilizada ou congelada, é vantajoso que a proteína reconstituída ou descongelada seja estável por mais tempo. Isto é evidente, por exemplo, quando o material foi reconstituído como uma precaução para um procedimento médico, mas seu uso não foi necessário devido a considerações médicas. Este material é tipicamente descartado, já que o fibrinogênio só é estável por um curto período de tempo devido à presença de protrombina e/ou t-PA e/ou outra(s) protease(s).

[0087] Em modalidades particulares, as preparações líquidas da presente invenção contendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF são armazenadas como uma preparação líquida ou liofilizada ou congelada.

[0088] Em outro aspecto da presente invenção, é apresentado um método para purificar fibrinogênio, o método compreendendo as etapas de:

- (i) passar uma solução compreendendo fibrinogênio através de uma resina cromatográfica de troca iônica sob condições selecionadas para que o monômero de fibrinogênio seja ligado à resina;
- (ii) eluir o monômero de fibrinogênio da resina com um tampão de eluição; e
- (iii) filtrar o monômero de fibrinogênio eluído da etapa (ii) através de um filtro que tem um tamanho de poro na faixa de cerca de 15

nm a cerca de 35 nm.

[0089] Em uma modalidade, a solução compreendendo fibrinogênio (etapa (i)) é recuperada após a passagem de uma matéria-prima compreendendo fibrinogênio através de uma resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica sob condições selecionadas para que o plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) seja ligado à resina e o fibrinogênio passe através da resina.

[0090] Em uma modalidade, a resina cromatográfica de troca iônica é selecionada a partir de uma resina cromatográfica de troca de ânions ou uma resina cromatográfica de troca de cátions.

[0091] Em uma modalidade, a resina cromatográfica de troca de ânions é uma resina cromatográfica de troca de ânions forte ou uma resina cromatográfica de troca de ânions fraca. Em uma modalidade, a resina cromatográfica de troca de ânions compreende um grupo amino quaternário. Exemplos incluem alquilamina quaternária e alquilalcanamina quaternária, ou amina, dietilamina, dietilaaminopropila, amino, trimetilamôniometila, trimetilbenzilamônio, dimetiletanolbenzilamônio, e poliamina. Em algumas modalidades, a resina cromatográfica de troca de ânions é um suporte polimérico enxertado com aminas terciárias ou quaternárias ou é um suporte polimérico hidroxilado enxertado com aminas terciárias ou quaternárias. Em algumas modalidades, a resina cromatográfica de troca de ânions compreende um suporte polimérico de metacrilato. Em uma modalidade, a resina cromatográfica de troca de ânions é MacroPrep™ HQ. Em outra modalidade, a resina cromatográfica de troca de ânions é GigaCap™ Q-650M. Em outras modalidades, a resina cromatográfica de troca de ânions é empacotada em uma coluna.

[0092] Se desejável, uma membrana de cromatografia de troca de ânion pode ser usada ao invés de uma resina de cromatografia de tro-

ca de ânion. As membranas de cromatografia de troca de ânions comercialmente disponíveis incluem, mas não se limitam a, Sartobind<sup>TM</sup> Q obtida junto à Sartorius, Mustang<sup>TM</sup> Q obtida junto à Pall Technologies e membrana Intercept<sup>TM</sup> Q obtida junto à Millipore.

[0093] Em uma modalidade, a resina cromatográfica de troca de cátions é uma resina cromatográfica de troca de cátions forte ou uma resina cromatográfica de troca de cátions fraca.

[0094] As resinas de cromatografia de troca de cátions comercialmente disponíveis incluem, mas não se limitam, por exemplo, àquelas tendo um grupo à base de sulfonato (por exemplo, MonoS, MiniS, Source<sup>TM</sup> 15S e 30S, SP Sepharose Fast Flow<sup>TM</sup>, SP Sepharose High Performance<sup>TM</sup> obtidas junto à GE Healthcare, Toyopearl<sup>TM</sup> SP-650S e SP-650M obtidas junto à Tosoh, Macro-Prep High<sup>TM</sup> S obtida junto à BioRad, Ceramic HyperD<sup>TM</sup> S, Trisacryl<sup>TM</sup> M e LS<sup>TM</sup> SP e Spherodex<sup>TM</sup> LS SP obtidas junto à Pall Technologies,); um grupo à base de sulfoetila (por exemplo, Fractogel<sup>TM</sup> SE obtida junto à EMD, Poros<sup>TM</sup> S-10 e S-20 obtidas junto à Applied Biosystems); um grupo à base de sulfopropila (por exemplo, TSK<sup>TM</sup> Gel SP 5PW e SP-5PW-HR obtidas junto à Tosoh, Poros<sup>TM</sup> HS-20 e HS 50 obtidas junto à Applied Biosystems); um grupo à base de sulfoisobutila (por exemplo, Fractogel<sup>TM</sup> EMD SO3" obtidas junto à EMD); um grupo à base de sulfoxetila (por exemplo, SE52, SE53 e Express-Ion S obtidas junto à Whatman), um grupo à base de carbóxi metila (por exemplo, CM Sepharose Fast Flow<sup>TM</sup> obtida junto à GE Healthcare, Hydrocell<sup>TM</sup> CM obtida junto à Biochrom Labs Inc., Macro-Prep<sup>TM</sup> CM obtida junto à BioRad, Ceramic HyperD<sup>TM</sup> CM, Trisacryl<sup>TM</sup> M CM, Trisacryl<sup>TM</sup> LS CM, obtidas junto à Pall Technologies, Matrex Cellufine<sup>TM</sup> C500 e C200 obtidas junto à Millipore, CM52<sup>TM</sup>, CM32<sup>TM</sup>, CM23<sup>TM</sup> e Express<sup>TM</sup> - íon C obtidas junto à Whatman, Toyopearl<sup>TM</sup> CM-650S, CM-650M e CM-650C obtidas junto à Tosoh); grupos á base de ácido sulfônico e carboxílico (por exemplo,

BAKERBOND<sup>TM</sup> Carboxy-Sulfon obtida junto à J.T. Baker); um grupo à base de ácido carboxílico (por exemplo, WP<sup>TM</sup> CBX obtida junto à J.T. Baker, DOWEX MAC-3<sup>TM</sup> obtida junto à Dow Liquid Separations, trocadores de cátions fracos Amberlite<sup>TM</sup>, trocador de cátions fracos DOWEX<sup>TM</sup>, e trocadores de cátions fracos Diaion<sup>TM</sup> obtidos junto à Sigma-Aldrich e Fractogel<sup>TM</sup> EMD COO- obtida junto à EMD); um grupo à base de ácido sulfônico (por exemplo, Hydrocell<sup>TM</sup> SP obtida junto à Biochrom Labs Inc., matriz de cátions de ácido forte e malha fina DOWEX<sup>TM</sup> obtida junto à Dow Liquid Separations, UNOsphere<sup>TM</sup> S, WP Sulfonic obtida junto à J. T. Baker, membrana Sartobind<sup>TM</sup> S obtida junto à Sartorius, trocadores de cátions fortes Amberlite<sup>TM</sup>, trocador de cátions fortes de diaíons e cátions fortes DOWEX<sup>TM</sup> obtidos junto à Sigma-Aldrich); e um grupo à base de ortofosfato (por exemplo, PI 1 obtido junto à Whatman). Se desejável, uma membrana de cromatografia de troca de cátions pode ser usada ao invés de uma matriz de troca de cátions, por exemplo, Sartobind<sup>TM</sup> S (Sartorius; Edgewood, NY, EUA).

[0095] Em uma modalidade, a solução compreendendo fibrinogênio tem um pH na faixa de cerca de pH 7 a pH 10. Em uma modalidade, o pH da solução compreendendo fibrinogênio é cerca de pH 8. Em algumas modalidades, a resina cromatográfica de troca de ânions será pré-equilibrada e lavada após o carregamento do fibrinogênio com tampão(ões) tendo um pH similar à solução compreendendo o fibrinogênio.

[0096] Em uma modalidade, o tampão de eluição tem uma condutividade na faixa de cerca de 18 a cerca de 30mS/cm. Por exemplo, a condutividade do tampão de eluição pode estar na faixa de cerca de 18 a cerca de 25 mS/cm; ou cerca de 19 a cerca de 24 mS/cm; ou cerca de 20 a cerca de 24 mS/cm; ou cerca de 21 a cerca de 23 mS/cm. Em uma modalidade, a condutividade do tampão de eluição é de cerca

de 22 mS/cm. Em outras modalidades, o tampão de eluição compreende NaCl. Em uma modalidade, o tampão de eluição compreende NaCl a uma concentração na faixa de cerca de 180mM a cerca de 230mM, ou cerca de 190mM a cerca de 210mM. Em uma modalidade, a concentração de NaCl no tampão de eluição é cerca de 200mM.

[0097] Em uma modalidade, o tampão de eluição compreendendo o fibrinogênio contém uma concentração de proteínas de cerca de 0,5 a cerca de 10mg/mL. Em algumas modalidades, a concentração de proteínas do tampão de eluição compreendendo o fibrinogênio está na faixa de cerca de 4 a cerca de 8 mg/mL. Em modalidades particulares, o tampão de eluição compreendendo o fibrinogênio está a cerca de 6 mg/mL.

[0098] Em uma modalidade, o monômero de fibrinogênio eluído é formulado com um ou mais aminoácidos antes da filtração (etapa (iii)). Em uma modalidade, o aminoácido é arginina ou glicina ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a concentração do aminoácido no tampão de eluição compreendendo fibrinogênio está na faixa de cerca de 0,5 a cerca de 10% (p/p). Em uma modalidade, a concentração do aminoácido no tampão de eluição compreendendo fibrinogênio é de cerca de 1% a cerca de 6% (p/p), ou cerca de 2% a cerca de 6% (p/p) ou cerca de 2% a cerca de 5% (p/p). Em uma modalidade, o tampão de eluição compreendendo o fibrinogênio é formulado com cerca de 2%, ou cerca de 3%, ou cerca de 4% ou cerca de 5% (p/p) de arginina.

[0099] Em uma modalidade, o monômero de fibrinogênio eluído tem um pH de cerca de pH 7 a cerca de pH 9.

[0100] Em uma modalidade, o filtro da etapa (ii) tem um tamanho de poro na faixa de cerca de 15 nm a cerca de 35 nm; ou de cerca de 15 nm a cerca de 30 nm; ou de cerca de 15 nm a cerca de 25 nm; ou de cerca de 15 nm a cerca de 20 nm.

[0101] A filtração de vírus pode ser feita usando filtração de fluxo tangencial (TFF) ou filtração ‘terminal’ (também conhecida como filtração de fluxo normal). Os filtros para vírus foram originalmente projetados para uso em TFF com a alimentação fluindo em posição adjacente à camada de cobertura superior da membrana assimétrica. TFF fornece alto fluxo por varredura da superfície da membrana para reduzir a polarização por concentração e incrustação. Entretanto, a simplicidade e o custo de capital mais baixo da filtração terminal levou ao uso amplamente distribuído de filtros para vírus especificamente projetados para a filtração terminal. Ao contrário de TFF, estes filtros terminais são tipicamente operados com o lado mais aberto da membrana voltado para a corrente de alimentação, permitindo aos agregados de proteína e outros incrustantes grandes serem capturados dentro da subestrutura macroporosa protegendo, assim, a camada de revestimento de retenção de vírus. As vantagens do uso de filtros terminais de uso único incluem que eles simplificam o design e a validação do sistema, reduzindo o trabalho e os custos de capital.

[0102] A filtração terminal envolve tipicamente o uso de uma única bomba para forçar o fluido através da membrana a partir da superfície.

[0103] A filtração tangencial geralmente exige uma primeira bomba para manter uma taxa de fluxo constante na superfície da membrana de filtro e uma segunda bomba extraí a proteína através da membrana pela criação de uma pressão negativa no fundo da membrana.

[0104] Em uma modalidade, a filtração é feita por filtração terminal.

[0105] Em uma modalidade, o processo de filtração terminal é conduzido usando filtração em pressão constante ou filtração em velocidade constante. Em uma modalidade, o processo de filtração terminal é conduzido usando filtração em pressão constante.

[0106] A filtração é tipicamente executada com uma pressão de filtração que é igual ou menor que o nível suportado pela membrana,

dependendo do material da membrana para remoção de vírus a ser usada aqui, por exemplo, com pressão de cerca de 0,2 a cerca de 3,4 bar. Em uma modalidade, a pressão de filtração é mantida entre cerca de 0,2 bar a cerca de 3,4 bar. Em outra modalidade, a pressão de filtração é mantida a cerca de 1 a cerca de 3 bar; ou cerca de 1 a cerca de 2 bar; ou cerca de 1,2 a cerca de 2 bar. Em outra modalidade, a pressão de filtração é mantida a cerca de 1,5 bar a cerca de 1,9 bar.

[0107] A temperatura pode ter um efeito sobre a viscosidade de uma solução de proteína e sobre o fluxo mediante filtração com uma membrana para remoção de vírus. Seria compreendido pelos versados na técnica que a solução a ser usada na etapa de filtração teria, tipicamente, uma temperatura dentro do intervalo de cerca de 0°C até a temperatura na qual a proteína de interesse é desnaturada. A temperatura da solução situa-se, adequadamente, dentro da faixa de cerca de 10°C até cerca de 50°C. Em uma modalidade, a temperatura da solução situa-se dentro da faixa de cerca de 18°C até cerca de 35°C. Em outra modalidade, a solução é filtrada à temperatura ambiente de cerca de 18°C a cerca de 26°C.

[0108] Em uma modalidade, a capacidade do filtro de vírus é pelo menos 0,20kg ou ao menos 0,50 kg ou ao menos 0,75 kg ou ao menos 1,00 kg ou ao menos 1,25 kg ou ao menos 1,50 kg ou ao menos 2 kg de fibrinogênio por m<sup>2</sup> de área superficial do filtro.

[0109] Opcionalmente, uma etapa de pré-filtração ou de filtração de clarificação pode ser feita antes da filtração de vírus de modo a remover partículas macro-dimensionadas. Em uma modalidade, uma pré-filtração é feita com um pré-filtro compreendendo uma membrana com um diâmetro de poro maior do que aquele da membrana de remoção de vírus. Em uma modalidade, o pré-filtro é uma membrana filtrante que tem um tamanho de poro de cerca de 0,1 µm. Em outra modalidade, o pré-filtro é selecionado a partir da membrana filtrante de

náilon Pall (SKL 7002 NTP 0,1 µm ou FTKNI), ou outros pré-filtros comercialmente disponíveis que têm propriedades similares para a remoção de agregados de proteína e/ou particulados. A pré-filtração pode ser conduzida em linha com o filtro de vírus ou fora de linha com relação ao filtro de vírus. Em uma modalidade, a pré-filtração é conduzida em linha com relação ao filtro de vírus.

[0110] Os filtros adequados para o método de filtração de vírus de acordo com este aspecto da invenção seriam conhecidos dos versados na técnica. Um exemplo inclui Planova BioEx<sup>TM</sup>, *inter alia*. Tais filtros são algumas vezes chamados de filtros de remoção ‘pequenos vírus’.

[0111] Em uma modalidade, a membrana filtrante é uma lâmina plana ou uma membrana de fibra oca. Exemplos de membranas de lâmina plana incluem membranas de filtro de PVDF hidrofilizadas como os filtros para remoção de pequenos vírus Pegasus<sup>TM</sup> grau SV4 (Pall Corporation). Em uma modalidade, o filtro é Pegasus<sup>TM</sup> grau SV4.

[0112] Em outras modalidades, o filtro é uma membrana de fibra oca. Uma membrana de fibra oca pode conter um feixe de fibras oca com formato de palha com a parede de cada fibra oca contendo uma estrutura de manta tridimensional de poros compostos de espaços vazios interconectados por finos capilares. Exemplos de filtros de fibra oca incluem os filtros Planova<sup>TM</sup> BioEX<sup>TM</sup> (Asahi Kasei Corporation) que incorpora fluoreto de polivinilideno hidrofílico modificado (PVDF) em formato de membrana de fibra oca. Em uma modalidade, o filtro é Planova<sup>TM</sup> BioEX.

[0113] Em uma modalidade, dois ou mais filtros para vírus pequenos são usados em série. Em uma modalidade, a filtração é conduzida usando dois filtros em série, tendo um tamanho de poro na faixa de cerca de 15 a cerca de 20 nm. Tais etapas de filtração têm o potencial de permitir ao fibrinogênio ser fabricado com pelo menos LRV 6.9 log

LRV para MVM semelhantes à parvovírus.

[0114] Em outro aspecto da presente invenção, a solução compreendendo fibrinogênio é passada através de uma resina cromatográfica de troca iônica sob condições selecionadas para que o fibrinogênio presente na solução passe através da resina. Ou seja, a cromatografia de troca iônica é feita em modo negativo com relação ao fibrinogênio sob condições tais que, quando a solução é passada através da resina, impurezas, tais como agregados de fibrinogênio, plasminogênio e fibronectina presentes na solução se ligam aos grupos funcionais carregados ligados à resina, permitindo ao fibrinogênio presente na solução, particularmente, monômero de fibrinogênio, passar através da resina na fração de fluxo de passagem (escoamento). Quando a fração de escoamento contendo fibrinogênio passa através da resina, a resina cromatográfica de troca de íons pode ser lavada com um tampão de lavagem adequado conhecido dos versados na técnica. Os constituintes do tampão de lavagem e as condições da etapa de lavagem serão tipicamente selecionados para reter as impurezas ligadas à resina durante a etapa de lavagem.

[0115] Em uma modalidade, a resina cromatográfica de troca iônica é selecionada a partir de uma resina cromatográfica de troca de ânions ou uma resina cromatográfica de troca de cátions.

[0116] Em uma modalidade, a solução compreendendo fibrinogênio é passada através de uma resina cromatográfica de troca de ânions na presença de cerca de 150mM a cerca de 270mM NaCl. Isto corresponde a um intervalo de condutividade de cerca de 18mS/cm (NaCl 150mM) a cerca de 29mS/cm (NaCl 270mM). Sob estas condições, o fibrinogênio, particularmente a forma monomérica, passa através da resina cromatográfica de troca de ânions enquanto os agregados contendo fibrinogênio e outras impurezas como plasminogênio e fibronectina se ligam à resina. Em modalidades adicionais, a solução

compreendendo fibrinogênio é passada através da resina cromatográfica de troca de ânions na presença de cerca de 170mM a cerca de 230mM de NaCl (cerca de 19 mS/cm a cerca de 25 mS/cm) ou cerca de 200mM a cerca de 220mM de NaCl (cerca de 22 mS/cm a cerca de 24 mS/cm). Sob estes tipos de condições, espera-se que as impurezas se liguem à resina cromatográfica de troca de ânions, permitindo ao fibrinogênio passar através da resina na fração de escoamento.

[0117] A solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF recuperada pelos métodos da presente invenção é vantajosa porque fornece uma preparação de fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF que tem mais estabilidade do que as preparações liofilizadas existentes, mesmo à temperatura ambiente. Isto pode ser particularmente vantajoso em rotas de transporte longas, onde as baixas temperaturas podem, quando apropriado, não ser garantidas durante o transporte e/ou armazenamento. O armazenamento estável de fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF em solução também facilita, em muitos aspectos, a produção, uso, transporte e administração a um paciente que necessite do mesmo. Devido à estabilidade aumentada do fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF preparado de acordo com a presente invenção, é possível, em muitas preparações farmacêuticas, dispensar a adição de agentes de estabilidade, como inibidores de fibrinólise ou fibrinogenólise que podem, em alguns casos, levar a efeitos colaterais indesejados ou que devem ser evitados para reduzir potenciais riscos.

[0118] O termo "estável", como usado aqui, significa que há pouca ou nenhuma perda substancial de atividade do fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF após um período de tempo em armazenamento, em comparação ao nível de atividade do fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF antes do armazenamento (por exemplo, em comparação com ao nível de atividade determinado imediatamente após a recuperação da solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF de acor-

do com a presente invenção). Em uma modalidade aqui apresentada, a solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF retém pelo menos 70% de atividade, de preferência ao menos 80% de atividade, com mais preferência pelo menos 90% de atividade, com mais preferência ainda pelo menos 95% de atividade e com a máxima preferência 100% de atividade após um período de tempo em armazenamento a uma temperatura de cerca de 0°C a cerca de 30°C. O versado na técnica irá compreender que a atividade do fibrinogênio pode ser determinada para a preparação de fibrinogênio imediatamente antes do início do período de armazenamento e este valor inicial pode ser usado para designar 100% de atividade a partir da qual a atividade do fibrinogênio determinada em diferentes pontos no tempo durante o período de armazenamento pode ser comparada e expressa como uma porcentagem deste valor inicial.

[0119] Em uma modalidade aqui apresentada, o fibrinogênio recuperado pelos métodos da presente invenção retém de cerca de 90% a 100% de atividade após pelo menos 4 semanas em armazenamento da solução a uma temperatura de cerca de 2°C a cerca de 8°C, de preferência, retém cerca de 90% de atividade após 4 semanas em armazenamento da solução a uma temperatura cerca de 2°C a cerca de 8°C. Em outra modalidade aqui apresentada, o fibrinogênio retém de cerca de 60% a cerca de 80% de atividade após pelo menos 4 semanas em armazenamento da solução a uma temperatura de cerca de 30°C, de preferência, retém de cerca de 60% a cerca de 70% de atividade após 5 semanas de armazenamento da solução a uma temperatura de cerca de 30°C. O nível de atividade do fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF pode ser determinado por quaisquer meios conhecidos dos versados na técnica. Exemplos de métodos adequados para determinar a atividade do fibrinogênio, por exemplo, são resumidos por Mackie *et al.* (*British J. Haematol.* 121:396-404, 2003). Os métodos

específicos incluem Clauss (Clauss, 1957, Acta-Haematol. 17, 237-246) e/ou proteína coagulável (Jacobsson K., Scand J Clin Lab Invest 1955;7 (supl 14):1-54 ou Fibrin sealant Ph. Eur. Monograph 903, 2012). Os resultados podem ser relatados como % de proteína coagulável; % de proteína coagulável inicial, e/ou % de atividade de fibrinogênio inicial, conforme determinado usando o método de Clauss ou similar.

[0120] O versado na técnica irá compreender que a concentração do plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) na solução recuperada compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF provavelmente irá determinar o tempo de armazenamento e/ou as condições de armazenamento (por exemplo, temperatura). Por exemplo, será compreendido que uma preparação na qual a concentração do plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) na solução recuperada é reduzida em 80% em comparação com a matéria-prima pode ser armazenada durante um período de tempo mais longo e/ou em temperaturas mais elevadas sem desestabilizar significativamente a atividade do fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF em comparação com uma preparação na qual a concentração do plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) na solução recuperada compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF é reduzida em apenas 50% em comparação com a matéria-prima.

[0121] Embora os métodos da presente invenção possam ser feitos em escala laboratorial, eles podem ser escalonáveis até o tamanho industrial sem alterações significativas às condições. Desta forma, em uma modalidade aqui apresentada, os métodos da presente invenção são feitos em uma escala industrial ou comercial. De preferência, os métodos da invenção são adequados para a fabricação em escala comercial de fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF. Por exemplo,

quando se usando frações de plasma como um material de partida no método da invenção, então, a fabricação em escala comercial envolveria o uso de uma fração de plasma derivada de ao menos cerca de 500 kg de plasma. Com mais preferência, a fração de plasma inicial será derivada de ao menos cerca de 5.000 kg, 7.500 kg, 10.000 kg e/ou 15.000 kg de plasma por lote. Em modalidades particulares, as soluções e formulações farmacêuticas compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF da presente invenção são fabricadas em escala comercial a partir de uma fração de plasma ou uma matéria-prima recombinante.

[0122] Quando uma solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF tem que ser usada para aplicações clínicas ou veterinárias (por exemplo, para administração a um indivíduo com deficiência de fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF ou para uso como uma cola de fibrina), pessoas versadas na técnica entenderão que pode ser desejável reduzir o nível do teor de vírus ativo (titulação viral) e outros agentes infecciosos potenciais (por exemplo, príons) na solução. Isto pode ser particularmente desejável quando a matéria-prima compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF (isto é, o material de partida) é derivado de plasma sanguíneo. Os métodos para reduzir a titulação viral em uma solução serão conhecidos dos versados na técnica. Exemplos incluem pasteurização (por exemplo, incubação da solução a 60°C durante 10 horas na presença de altas concentrações de estabilizadores como glicina (por exemplo, 2,75M) e sacarose (por exemplo, 50%) e/ou outros excipientes ou sais selecionados), tratamento térmico a seco, filtração de vírus (passando a solução através de um nano-filtro; por exemplo, corte de 20nm) e/ou submetendo a solução a tratamento com um solvente orgânico e um detergente adequados durante um período de tempo e sob condições para inativar o vírus na solução. Detergente de solvente tem sido usado durante mais

de 20 anos para inativar os vírus envelopados, particularmente, em produtos derivados do plasma, incluindo fibrinogênio e fator VIII e/ou VWF. Desta forma, isto pode ser executado usando vários reagentes e métodos conhecidos na técnica (consulte, por exemplo, US 4540573 e US4764369 que estão aqui incorporados, por referência). Os solventes adequados incluem fosfato de tri-n-butila (TnBP) e éter, de preferência, TnBP (tipicamente a cerca de 0,3%). Os detergentes adequados incluem polissorbato (Tween) 80, polissorbato (Tween) 20 e Triton X-100 (tipicamente a cerca de 0,3%). A seleção das condições de tratamento incluindo as concentrações de solvente e detergente dependem, em parte, das características da matéria-prima com matérias primas menos puras exigindo geralmente concentrações maiores de reagentes e condições de reação mais extremas. Um detergente preferido é polissorbato 80 e uma combinação particularmente preferencial é polissorbato 80 e TnBP. A matéria-prima pode ser agitada com reagentes de solvente e detergente em uma temperatura e durante tempo suficiente para inativar quaisquer vírus envelopados que possam estar presentes. Por exemplo, o tratamento com detergente de solvente pode ser executado durante cerca de 4 horas a 25°C. Os produtos químicos de detergente de solvente são subsequentemente removidos, por exemplo, por adsorção em meios cromatográficos como resinas C-18 hidrofóbicas ou eluição dos mesmos na fração de escoamento de resinas de troca iônica sob condições que adsorvem a proteína de interesse.

[0123] A etapa de inativação do vírus pode ser feita em qualquer estágio adequado dos métodos aqui revelados. Em uma modalidade, a matéria-prima compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF é submetida a uma etapa de inativação viral antes da etapa (i). Em outra modalidade, a solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF que é recuperada da resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica (isto é, das etapas (ii) e/ou (iv)) é submetida a uma etapa

de inativação viral. Em uma modalidade aqui apresentada, a etapa de inativação viral compreende pasteurização ou tratamento com um solvente orgânico e detergente. Em outra modalidade aqui apresentada, a etapa de inativação viral compreende filtração do vírus. Quando a filtração do vírus é usada, os inventores descobriram que a adição de um aminoácido livre (por exemplo, arginina) antes da etapa de filtração pode melhorar a taxa de fluxo e recuperação do fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF através do filtro. Um exemplo deste método é descrito em US7919592.

[0124] Em uma modalidade aqui apresentada, a matéria-prima ou solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF é submetida a uma etapa de inativação viral antes de ser passada através da resina cromatográfica de troca de ânions. A vantagem de empregar uma etapa de inativação viral como um tratamento com detergente de solvente antes de passar a solução ou matéria-prima tratada através de uma resina cromatográfica de troca de ânions é que a resina de troca de ânions permite a remoção do solvente orgânico e detergente da solução tratada pelo uso de condições que promovem a ligação do fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF à resina e remoção do solvente orgânico e detergente com a fração de fluxo de passagem (escoamento).

[0125] Pasteurização pode gerar agregados de proteína e polímeros, particularmente, em uma solução compreendendo fibrinogênio (também chamada na presente invenção de "*solução de fibrinogênio*"). Portanto, pode ser desejável, em alguns casos, reduzir o nível de agregados/polímeros em uma solução pasteurizada. Isto pode ser obtido por quaisquer meios conhecidos dos versados na técnica, embora, convenientemente, possa ser obtido por purificação cromatográfica adicional. Em uma modalidade aqui apresentada, a solução ou matéria-prima pasteurizada é passada através de uma resina cromatográfica

ca de troca de ânions em modo positivo com relação ao fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF, de modo que quaisquer agregados ou polímeros sejam removidos com a fração de fluxo de passagem (escoamento).

[0126] O termo “*matéria-prima*” é usado na presente invenção para denotar qualquer solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF. A matéria-prima pode compreender também outras proteínas (por exemplo, proteínas terapêuticas) conhecidas dos versados na técnica. Exemplos incluem proteínas envolvidas na cascata de coagulação sanguínea. Em uma modalidade aqui apresentada, a matéria-prima compreende fibrinogênio.

[0127] A matéria-prima adequada compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF será conhecida dos versados na técnica. Exemplos incluem plasma ou frações de plasma, como crioprecipitado de plasma solubilizado plasma ou pasta solubilizada de fração I deriva de plasma humano ou animal ou uma fração de plasma, frações de cultura celular de tecnologia recombinante, frações derivadas de leite de animais transgênicos, etc. As fontes de proteínas de fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF recombinantes também são adequadas para uso como uma matéria-prima de acordo com a presente invenção. Quando a matéria-prima é plasma ou uma fração de plasma, ela pode ser doações de plasma agrupado ou pode ser de um doador individual. Em uma modalidade aqui apresentada, a matéria-prima compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF é um crioprecipitado de plasma solubilizado. Este componente, derivado do sangue total ou coletado por aférese, é preparado pelo descongelamento controlado de plasma fresco congelado entre 1 a 6°C e recuperação do precipitado. O precipitado insolúvel a frio é recongelado. Uma unidade de aférese de crioprecipitado é aproximadamente equivalente a 2 unidades de crioprecipitado derivadas do sangue total. Ela contém a maioria do

fibrinogênio, fator VIII e VWF junto com outras proteínas, tais como fator XIII e fibronectina do plasma fresco congelado. Uma fonte alternativa de fibrinogênio é precipitado da fração I que pode ser preparada a partir de plasma congelado por descongelamento e remoção do crioprecipitado por centrifugação ou filtração. O criosobrenadante resultante é, então, misturado com etanol para precipitar a fração I. Por exemplo, um precipitado de fração I pode ser obtido pela adição de cerca de 8% (v/v) de etanol a pH 7,2 e controle da temperatura para cerca de -3°C (Cohn, *et al.* 1946, J. Am. Chem. Soc. 62: 459–475). Em uma modalidade, a matéria-prima compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF é crioprecipitada.

[0128] Referência no relatório descritivo a "*protease(s)*" pode ser a qualquer protease e/ou seu zimogênio presente na matéria-prima ou solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF que, quando exposta a uma resina de HCIC, é capaz de se ligar à resina de HCIC sob condições nas quais o fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF passa através da resina. As proteases podem ser de qualquer tipo, incluindo serina proteases (por exemplo, plasmina, trombina, tripsina), treonina proteases, cisteína proteases (por exemplo, catepsina B e catepsina H), aspartato proteases (por exemplo, pepsina), metaloproteases (por exemplo, collagenases e gelatinases) e proteases glutâmicas. Quando a matéria-prima compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF é derivada de plasma humano ou animal, as proteases/zimogênios podem incluir plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual (tPA), trombina, elastase, fator VIIa, fator IXa, fator Xa, fator XIa, fator XIIa, fator XIIIa, calicreínas plasmáticas e similares. Em relação a soluções compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF, uma protease/zimogênio preferencial particular a ser removida é o plasminogênio. Outras proteases/zimogênios preferenciais a serem removidas de uma solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII

e/ou VWF são t-PA, pró- e/ou trombina ativa (fator II/IIa). Quando a matéria-prima compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF é derivado de um sobrenadante de cultura celular, a protease/zimogênio pode incluir qualquer protease de célula hospedeira, como serina proteases (por exemplo, caseinases), metaloproteases (por exemplo, gelatinases, metaloproteases de matriz (MMP) incluindo MMP3, MMP10 ou MMP12), proteases aspárticas (catepsina D), proteases ácidas, entre outras.

[0129] Em alguns casos, pode ser desejável remover ou reduzir o nível de impurezas da matéria-prima antes de passar a matéria-prima através de uma resina de HCIC na etapa (i). A remoção ou redução do nível de impurezas da matéria-prima pode reduzir a carga sobre a resina de HCIC durante a purificação cromatográfica e, desta forma, melhorar a eficiência da separação do plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) da matéria-prima. As impurezas podem ser removidas ou reduzidas, por exemplo, por precipitação de fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF da matéria-prima e recuperação da(s) proteína(s) precipitada(s). Os métodos adequados para precipitar fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF a partir de uma matéria-prima compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF serão conhecidos dos versados na técnica. Um exemplo inclui a adição de suspensão de hidróxido de alumínio à matéria-prima, o que é particularmente útil para remover proteínas dependentes de vitamina K (por exemplo, os fatores de coagulação II, VII, IX, e X) e outras proteínas que têm afinidade de ligação pelo hidróxido de alumínio, como protrombina (fator II) e t-PA, do plasma ou crioprecipitado de plasma.

[0130] Desta forma, em uma modalidade aqui apresentada, antes da etapa (i), as proteínas dependentes de vitamina K são removidas ou reduzidas da matéria-prima. Em uma modalidade adicional, as proteínas dependentes de vitamina K são removidas ou reduzidas pela

adição de hidróxido de alumínio à matéria-prima. O hidróxido de alumínio pode estar sob a forma de Alhydrogel®, adicionado à matéria-prima para uma concentração final de cerca de 10% a cerca de 80% p/p. Em algumas modalidades, o hidróxido de alumínio é adicionado à matéria-prima até uma concentração final na faixa de cerca de 10% a cerca de 50% (p/p). Em outras modalidades, o hidróxido de alumínio é adicionado à matéria-prima para uma concentração final na faixa de cerca de 10% a cerca de 30% (p/p). Em modalidades preferenciais, a concentração é de cerca de 15% a cerca de 30% (p/p). Com a máxima preferência, o hidróxido de alumínio é adicionado à matéria-prima a cerca de 15% a cerca de 25% (p/p) para recuperação de fibrinogênio ótima e remoção de impurezas, tais como protrombina. Em outra modalidade, as proteínas dependentes de vitamina K são removidas da matéria-prima por adsorção em batelada usando hidróxido de alumínio.

[0131] Em outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF que é recuperada pelo método da presente invenção, conforme aqui descrito. Em uma modalidade, o nível de plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) na solução será de menos de 20% da proteína total, de preferência, menos de 10% da proteína total, e com mais preferência, menos de 5% da proteína total, ou menos que 1% da proteína total, ou menos que 0,1% da proteína total, ou menos que 0,01% da proteína total ou menos que 0,001% da proteína total, ou menos que 0,0001% da proteína total. O versado na técnica irá compreender que o nível de plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) que está presente na solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF pode depender do uso pretendido da solução ou duração de tempo de armazenamento. Por exemplo, quando a solução tem que ser armaze-

nada durante pelo menos 4 semanas a uma temperatura de cerca de 0°C a cerca de 8°C, pode ser aceitável que a solução compreenda mais que cerca de 10% de plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) (da proteína total). Quando a solução tem que ser armazenada durante pelo menos 4 semanas a uma temperatura de cerca de 30°C, pode ser desejável que a solução compreenda menos que cerca de 10% de plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s) (da proteína total).

[0132] Em uma modalidade aqui apresentada, é fornecida uma solução compreendendo fibrinogênio recuperado pelo método da presente invenção. Em outra modalidade, a solução compreende pelo menos 80% de proteína total de fibrinogênio.

[0133] Em outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma solução compreendendo:

- (a) pelo menos 75% de proteína total de fibrinogênio;
- (b) menos de 50 pg/mg de proteína total de ativador do plasminogênio tecidual; e/ou
- (c) menos de 1 mg/mg de proteína total de plasminogênio.

[0134] Em uma modalidade, a solução compreende, adicionalmente, menos de  $1,5 \times 10^{-5}$  U/mg de proteína total de fator II.

[0135] Em outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma solução compreendendo:

- (a) pelo menos 90% de proteína total de fibrinogênio;
- (b) menos de 50 pg/mg de proteína total de ativador do plasminogênio tecidual; e/ou
- (c) menos de 150 ng/mg de proteína total de plasminogênio.

[0136] Em uma modalidade, a solução compreende, adicionalmente:

- (a) menos de  $3,5 \times 10^{-6}$  U/mg de proteína total de fator II; e/ou
- (b) menos de 150 µg/mg de proteína total de fibronectina.

[0137] Em outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma solução compreendendo:

- (a) pelo menos 90% de proteína total de fibrinogênio;
- (b) menos de 50 pg/mg de proteína total de ativador do plasminogênio tecidual; e/ou
- (c) menos de 10 ng/mg de proteína total de plasminogênio.

[0138] Em outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma solução compreendendo:

- (a) pelo menos 90% de proteína total de fibrinogênio;
- (b) menos de 20 pg/mg de proteína total de ativador do plasminogênio tecidual; e/ou
- (c) menos de 10 ng/mg de proteína total de plasminogênio.

[0139] EM uma modalidade, a solução compreende, adicionalmente:

- (a) menos de  $2,7 \times 10^{-6}$  U/mg de proteína total de fator II; e/ou
- (b) menos de 15 mg/mg de proteína total de fibronectina.

[0140] A concentração do fibrinogênio e/ou do fator VIII e/ou VWF na solução recuperada pelos métodos aqui apresentados e a concentração de impurezas (por exemplo, plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s)) pode ser medida por quaisquer meios conhecidos dos versados na técnica. Exemplos de ensaios adequados para medir o fibrinogênio são descritos por Mackie *et al.* (*Br J Haematol.* 2003 maio;121(3):396-404). HPLC por exclusão de tamanho pode, também, ser usada para medir a concentração de fibrinogênio e/ou fator VIII ou uma impureza na solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII (por exemplo, Cardinali *et al.* 2010, *Arch. Biochem. Biophys.* 493(2):157-168; e Kosloski *et al.* 2009, *AAPS J.* 11(3): 424-431). A HPLC também permite ao versado na técnica discriminar entre monômeros e agregados de fibrinogênio. Além disso, a concentração de fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF pode ser dife-

rentes dependendo da sensibilidade do ensaio que é usado. Por exemplo, a concentração de fibrinogênio em uma solução, conforme medido usando o ensaio de Clauss, pode ser ligeiramente menor que a concentração medida na mesma solução por HPLC.

[0141] Em uma modalidade aqui apresentada, a concentração de fibrinogênio monomérico na solução é pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou ao menos 95% de proteína total, conforme medido por HPLC de exclusão de tamanho.

[0142] Em outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma formulação farmacêutica compreendendo uma solução que compreende fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF recuperado pelos métodos aqui apresentados, e um veículo farmaceuticamente aceitável. Os veículos farmaceuticamente aceitável adequados, incluindo diluentes e/ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis, serão conhecidos pelos versados na técnica. Exemplos incluem solventes, meios de dispersão, agentes fungicidas e antibacterianos, tensoativos, agentes isotônicos e de absorção e similares.

[0143] A formulação farmacêutica pode, também, ser formulada mediante a adição de uma combinação de estabilizadores adequados, por exemplo, um aminoácido, um carboidrato, um sal, e um detergente. Em modalidades particulares, o estabilizador compreende uma mistura de um álcool de açúcar e um aminoácido. O estabilizante pode compreender uma mistura de um açúcar (por exemplo, sacarose ou trealose), um álcool de açúcar (por exemplo, manitol ou sorbitol), e um aminoácido (por exemplo, prolina, glicina e arginina). Em uma modalidade preferencial, a formulação compreende um aminoácido, tal como arginina. Em outras modalidades, a formulação compreende íons metálicos divalentes em uma concentração de até 100mM e um agente complexante, conforme descrito no documento US7045601. Modalidades particulares incluem as formulações 1 a 7 descritas no Exemplo 1

de US7045601. Em modalidades particulares, a formulação é formulada sem a adição de nenhum agente anti-fibrinolítico ou proteínas estabilizantes como albumina. Em modalidades nas quais a formulação compreende fibrinogênio, o pH é, de preferência, cerca de 6,5 a 7,5 e a osmolalidade é pelo menos 240 mosmol/kg.

[0144] A formulação farmacêutica pode, também, ser esterilizada por filtração antes da dispensação e armazenamento a longo prazo. De preferência, a formulação irá reter substancialmente suas características de estabilidade originais durante pelo menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36 ou mais meses. Por exemplo, formulações armazenadas a 2 a 8°C ou 25°C podem, tipicamente, reter substancialmente a mesma distribuição de tamanho molecular, conforme medido por HPLC-SEC, quando armazenadas durante 6 meses ou mais. Modalidades específicas da formulação farmacêutica podem ser estáveis e adequadas para uso farmacêutico comercial durante pelo menos 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 36 meses ou até mesmo mais tempo, quando armazenada a 2 a 8°C e/ou temperatura ambiente.

[0145] As soluções e formulações farmacêuticas da presente invenção, conforme aqui descrito, podem ser formuladas em qualquer um dentre muitas formas de dosagem possíveis, como formulações injetáveis. As formulações e sua administração subsequente (dosagem) estão dentro da perícia daqueles versados na técnica. A administração depende da capacidade de resposta do indivíduo ao tratamento, mas irá durar invariavelmente por tanto tempo quanto o efeito desejável for necessário (por exemplo, um retorno aos níveis plasmáticos normais de fibrinogênio). Pessoas versadas na técnica podem determinar facilmente as dosagens, metodologias de administração e taxas de repetição ótimas.

[0146] Em uma modalidade aqui apresentada, a formulação farmacêutica da presente invenção tem um volume de pelo menos 5 mL

e compreende pelo menos 5 mg/mL de fibrinogênio. Em outra modalidade, a formulação farmacêutica tem um volume de pelo menos 5 mL e compreende pelo menos 20 mg/mL de fibrinogênio. Em modalidades particulares, a formulação farmacêutica tem um volume de pelo menos 5 mL e compreende fibrinogênio a uma concentração de cerca de 20 mg/mL, 25 mg/mL, 30 mg/mL, 35 mg/mL, 40 mg/mL, 45 mg/mL, 50 mg/mL, 55 mg/mL, 60 mg/mL, 65 mg/mL, 70 mg/mL, 75 mg/mL, 80 mg/mL, 90 mg/mL ou 100 mg/mL. Em outro aspecto, é fornecido um frasco contendo pelo menos 5 mL de uma solução de fibrinogênio estável farmaceuticamente aceitável, em que a concentração de fibrinogênio é pelo menos 20 mg/mL.

[0147] Em outro aspecto da presente invenção, é apresentado um método para tratar ou prevenir uma condição associada com deficiência de fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF, o método compreendendo a administração a um indivíduo que necessite, de uma solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF recuperado pelo método da presente invenção, conforme revelado aqui, ou a formulação farmacêutica da presente invenção, conforme revelada aqui.

[0148] Em outro aspecto da presente invenção, é fornecido o uso de uma solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF recuperado pelo método da presente invenção, conforme revelado na presente invenção, na fabricação de um medicamento para tratar ou prevenir uma condição associada com deficiência de fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF. Os versados na técnica estarão familiarizados com os tipos de condições associadas com a deficiência de fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF. Em uma modalidade, a condição relacionada ao fibrinogênio é selecionada do grupo que consiste em afibrinogenemia, hipofibrinogenemia e disfibrinogenemia. Em uma modalidade, a condição relacionada ao fator VIII e/ou VWF é selecionada do grupo que consiste em hemofilia A, distúrbios de sangramento (por

exemplo, função plaquetária defeituosa, trombocitopenia ou doença de von Willebrand), lesão vascular, sangramento causado por trauma ou cirurgia, sangramento devido à terapia com anticoagulante, sangramento devido a doença hepática.

[0149] Outras condições que podem ser tratáveis com uma solução compreendendo fibrinogênio e/ou fator VIII e/ou VWF recuperado pelos métodos da presente invenção, conforme revelado aqui, incluem ferimentos importantes e hemorragia grave e queimaduras. Em casos de hipofibrinogenemia e afibrinogenemia, uma solução compreendendo fibrinogênio preparada de acordo com a presente invenção pode ser injetada intravenosamente no paciente que necessite da mesma de modo a compensar o estado de deficiência de fibrinogênio e as dosagens podem ser determinadas pelo versado na técnica com base no grau de deficiência.

[0150] Uma solução compreendendo fibrinogênio recuperado pelos métodos da presente invenção tem, também, vantagens no uso de colas de fibrina (também conhecidas como selantes de fibrina) devido à falta de níveis desestabilizantes de plasminogênio e/ou ativador do plasminogênio tecidual e/ou outra(s) protease(s). O tPA converte o plasminogênio em sua forma ativa, plasmina, que, por sua vez, digere o coágulo de fibrina e, portanto, reduz a formação de coágulos mediante aplicação tópica (por exemplo, para hemostase).

[0151] As colas de fibrina compreendem, tipicamente, dois componentes: (i) fibrinogênio (frequentemente junto com fator XIII e um inibidor de fibrinólise como aprotinina), e (ii) trombina (frequentemente junto com íons cálcio). Os dois componentes são reconstituídos de modo a preparar a cola pronta para uso. A cola de fibrina é usada em aplicações clínicas e veterinárias para simular a última etapa da coagulação através da formação de fibras de fibrina reticuladas usando uma combinação de fibrinogênio com trombina na presença de cálcio

e fator XIII. A cola de fibrina tem diversas aplicações em medicina clínica e veterinária, que inclui hemostase, fechamento de lesões, profilaxia de adesão e cura de ferimentos. A cola de fibrina também pode ser usada para fechar lesões de pele (incluindo transplante de pele), para selar suturas e para unir tecidos conjuntivos, como osso, cartilagem e tendões. Desta forma, em outro aspecto aqui apresentado, é fornecida uma cola de fibrina compreendendo a solução compreendendo fibrinogênio recuperada pelos métodos da presente invenção, conforme revelado aqui.

[0152] Os versados na técnica apreciarão que a invenção aqui descrita é suscetível a variações e modificações além daquelas especificamente descritas. Deve ser compreendido que a invenção inclui todas as variações e modificações que se enquadram no espírito e escopo. A invenção também inclui todas as etapas, características, composições e compostos mencionados ou indicados neste relatório descriptivo, individualmente ou coletivamente, e toda e quaisquer combinações de quaisquer duas ou mais das etapas ou características.

[0153] Certas modalidades da invenção serão agora descritas com referência aos seguintes exemplos, que são concebidos apenas com o propósito de ilustração e não se destinam a limitar o escopo da generalidade descrita acima.

## **EXEMPLOS**

### ***Exemplo 1 – Purificação de fibrinogênio através de resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica (HCIC) HEA, PPA e MEP***

[0154] Crioprecipitado de plasma humano agrupado foi usado como o material de partida (isto é, matéria-prima contendo fibrinogênio). Resumidamente, o crioprecipitado de plasma agrupado foi solubilizado em um tampão de extração contendo citrato trisódico 20 mM, ácido epsilon-amino caproico 200 mM ( $\epsilon$ -ACA), 60 IU/mL de heparina e NaCl 500 mM (pH  $7,2 \pm 2$ ) a  $31 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 30 minutos (1g de crioprecipi-

tado por 4g de tampão). Hidróxido de alumínio 2% (p/p) foi, então, adicionado ao crioprecipitado solubilizado a uma concentração de 25% (p/p). Após isto, o gel de hidróxido de alumínio foi removido por centrifugação ou filtração profunda e o sobrenadante contendo fibrinogênio foi recuperado para purificação cromatográfica adicional através de uma resina cromatográfica de HCIC.

[0155] O sobrenadante contendo fibrinogênio foi aplicado a colunas de cromatografia que foram empacotadas com 1,8 mL de resina HEA, PPA ou MEP Hypercel<sup>TM</sup>. As colunas de cromatografia foram pré-equilibradas em Tris 25 mM em um pH diferente, na faixa de 6,5 a 8,5. O sobrenadante contendo fibrinogênio foi carregado na coluna de cromatografia a uma razão de aproximadamente 11 mL/mL de resina. A purificação por HCIC foi feita em modo negativo com relação ao fibrinogênio, no qual o fibrinogênio foi deixado passar na fração de escoamento não ligada, enquanto que a maior parte do t-PA, plasminogênio e Factor II permaneceu ligada à resina.

[0156] *As figuras 1 to 3* mostram a etapa de recuperação de fibrinogênio, plasminogênio, t-PA e fator II após a purificação cromatográfica usando HEA Hypercel<sup>TM</sup>, PPA Hypercel<sup>TM</sup> e MEP Hypercel<sup>TM</sup>. Os resultados mostram que o pH tem pouco ou nenhum efeito sobre a ligação do plasminogênio a estas resinas, enquanto que a ligação do t-PA às resinas parece ser mais eficaz na faixa mais baixa de pH. A coluna HEA Hypercel<sup>TM</sup> mostrou a maior recuperação de fibrinogênio na fração de escoamento e a faixa de pH de funcionamento pareceu ter pouco efeito sobre a recuperação de fibrinogênio em comparação com aquela observada para as colunas de PPA e MEP Hypercel<sup>TM</sup>. Ambas as colunas de PPA e MEP apresentaram a maior recuperação de fibrinogênio na fração de escoamento em pH 8,5.

***Exemplo 2 – Nível de impurezas em uma solução de fibrinogênio reduzida através de HEA Hypercel***

[0157] Aproximadamente 48,5 mL do crioprecipitado solubilizado contendo fibrinogênio preparado de acordo com o Exemplo 1 foram aplicados a uma coluna de 5 mL de HEA Hypercel™ que foi pré-equilibrada em Tris 25 mM em pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 ou 8,5. A purificação por HCIC foi feita em modo negativo com relação ao fibrinogênio, no qual o fibrinogênio foi deixado passar na fração de escoamento não ligada, enquanto que o t-PA, o plasminogênio e o Factor II permaneceram ligados à resina. A figura 4a mostra a etapa de recuperação de fibrinogênio, plasminogênio, t-PA e fator II durante a purificação pós-cromatográfica usando HEA Hypercel™. Os resultados mostram que o pH teve pouco ou nenhum efeito sobre a ligação de plasminogênio e fator II à resina de HCIC, enquanto que a ligação de t-PA à resina pareceu ser mais eficaz na faixa pH mais baixa de 6,5 a 7,0. A recuperação do fibrinogênio foi maior que 90% na fração de escoamento sob diferentes condições de pH apesar de nenhuma lavagem da coluna ter sido feita. Conforme mostrado na figura 4a, estes resultados demonstram a remoção eficaz de proteases em uma matéria-prima bruta contendo fibrinogênio, tal como crioprecipitado solubilizado, pela resina de HCIC. Por exemplo, a condição experimental feita em pH 7,0 demonstrou uma redução de  $\geq 99,9\%$  para o fator II, 88,3% para t-PA e  $\geq 98,2\%$  para plasminogênio a partir da solução de crioprecipitado solubilizada.

[0158] O fibrinogênio permaneceu estável na solução durante pelo menos 6 dias à temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). Os resultados são apresentados nas figuras 4b e 4c.

***Exemplo 3 – Nível de impurezas em uma solução de fibrinogênio purificada através de HEA Hypercel***

[0159] Aproximadamente 500 mL do sobrenadante contendo fibrinogênio obtido após a etapa de adsorção em Alhydrogel™, gerado de acordo com o Exemplo 1, foram carregados em uma coluna XK 16/30

empacotada com 36 mL de resina HEA Hypercel™, pré-equilibrada em Tris 25 mM pH 7,0. A fração de escoamento foi coletada para realização de teste de fibrinogênio, plasminogênio, t-PA, e fator II. Um resumo dos resultados é fornecido na *tabela 1* abaixo.

**TABELA 1**

	Volu-me (mL)	Proteína (mg/mL)	Fibrino-gênio por Clauss (mg/mL)	Plasmino-gênio (ng/mL)	t-PA (rg/mL)	Fator II (U/mL)
Sobrenadante de fibrinogênio	500	21,8	16,0	53172,0	1716,5	0,00097
Fração de escoamento	540	17,6	13,2	15655,5	706,7	0,00025
% de recuperação na fração de escoamento		87,2 %	89,1%	31,8 %	44,5 %	27,8 %

***Exemplo 4 – O efeito da precipitação de glicina sobre o nível de impurezas em uma solução de fibrinogênio purificada através de HEA Hypercel***

[0160] O sobrenadante contendo fibrinogênio após a etapa de adsorção em Alhydrogel, gerado de acordo com o Exemplo 1, foi submetido a uma etapa de precipitação adicional pela adição de uma solução salina compreendendo glicina 2,4M, NaCl 2,7M, CaCl<sub>2</sub> 2,1mM e citrato trisódico 23mM (pH 6,6 a 7,3). O precipitado solubilizado foi aquecido a 30°C antes de ser adicionado ao tampão de glicina, que também foi

incubado a 30°C, a uma razão entre o produto e o tampão de 1:2. A mistura foi deixada em agitação durante 10 minutos e o precipitado resultante foi recuperado da fase líquida por centrifugação. A fase líquida, que continha predominantemente fibronectina e IgG, foi descartada e o precipitado contendo fibrinogênio foi coletado e ressuspenso em um tampão de solubilização contendo NaCl 100mM, CaCl<sub>2</sub> 1,1mM, citrato trisódico 10mM, tris-(hidroximetil metilamina) 10mM e sacarose 4,5mM (pH 7,0). O intermediário de fibrinogênio solubilizado (250 mL) foi clarificado usando um filtro de 1mm antes de ser passado através de uma coluna XK 16/30 empacotada com 36 mL de resina HEA Hypercel<sup>TM</sup> pré-equilibrada em Tris 25mM pH 7,0. A fração de escoamento foi coletada para realização de testes de fibrinogênio, plasminogênio, t-PA e fator II e um resumo dos resultados é fornecido na tabela 2 abaixo.

[0161] Os resultados demonstram que a ligação de plasminogênio, t-PA e fator II à resina de HEA Hypercel<sup>TM</sup> foi mais eficaz sob estas condições de processamento em comparação àquela observada sob as condições descritas no Exemplo 2. Os resultados de caracterização mostram uma recuperação na etapa de aproximadamente 93% para o fibrinogênio, 6% para plasminogênio, 12% para t-PA e 5 % para o fator II.

**TABELA 2**

	Volu-me (mL)	Proteína (mg/mL)	Fibrinogênio por Clauss (mg/mL)	Plasminogênio (ng/mL)	t-PA (rg/mL)	Fator II (U/mL)
Intermediário de fibrinogênio solubilizado	250,0	29,7	30,3	48457,0	3408,4	0,002

Fração de escoamento	285,2	26,4	24,6	2646,8	984,2	0,00008
% de recuperação na fração de escoamento		101 %	92,6	6,2 %	12,3 %	4,6 %

***Exemplo 5 – Preparação de fibrinogênio purificado a partir de crioprecipitado de plasma***

[0162] Etapa de processamento 1 – Solubilização de crioprecipitado de plasma;

[0163] Etapa de processamento 2 – Concentração de adsorção de Alhydrogel<sup>TM</sup> (hidróxido de alumínio) (Alhydrogel<sup>TM</sup>: alvo 15 a 20% p/p, na faixa de 10 a 50% p/p) de crioprecipitado de plasma solubilizado e recuperação de sobrenadante contendo fibrinogênio usando métodos como centrifugação ou filtração profunda na presença de um auxílio de filtração. Alternativamente, esta etapa pode ser substituída por uma etapa cromatográfica de HCIC em modo negativo (escoamento) com relação ao fibrinogênio ou uma combinação de HCIC e cromatografia de troca de ânions, ambas em modo negativo com relação ao fibrinogênio. Se ambas a HCIC e a cromatografia de troca de ânions forem usadas em combinação, então, a etapa de processamento 3 é opcional;

[0164] Etapa de processamento 3 – Precipitação de fibrinogênio por glicina a partir do sobrenadante contendo fibrinogênio da etapa 2. Alternativamente, esta etapa pode ser trocada por uma cromatografia de troca de ânions em modo negativo com relação ao fibrinogênio;

[0165] Etapa de processamento 4 – Passagem do precipitado de glicina solubilizado da etapa 3 através de uma resina cromatográfica de HCIC em modo negativo com relação ao fibrinogênio;

[0166] Etapa de processamento 5 – Tratamento da solução de fi-

brinogênio purificado recuperada na etapa 4 com solvente ou detergente ou pasteurização para inativar patógenos;

[0167] Etapa de processamento 6 – Passagem da solução tratada da etapa 5 através de uma resina cromatográfica de troca de ânions em modo positivo com relação ao fibrinogênio, lavagem das proteínas fracamente ligadas da resina e eluição do fibrinogênio da resina;

[0168] Etapa de processamento 7 – Submeter o fibrinogênio eluído da resina de troca de ânions na etapa 6 à nanofiltração (35nm ou 20nm ou uma combinação de 35/20 nm); e

[0169] Etapa de processamento 8 – Submeter o fibrinogênio filtrado da etapa 7 à ultrafiltração (membranas filtrantes de 50, 100, 200 e 300 kDa).

***Exemplo 6 – Preparação de fibrinogênio purificado por uma combinação entre HCIC e cromatografia de troca de ânions***

[0170] Três experimentos em escala laboratorial foram completados, nos quais aproximadamente 100 g de crioprecipitado foram preparados de acordo com as etapas descritas nos exemplos 1 a 3 através da etapa de cromatografia em modo misto usando uma coluna HEA Hypercel<sup>TM</sup>.

[0171] A fração de escoamento (drop-through) da coluna HEA Hypercel<sup>TM</sup>, que continua predominantemente fibrinogênio, foi submetida a um tratamento de um dia para o outro com solvente/detergente para inativação do vírus.

[0172] A solução com inativação viral foi, então, diluída para  $\leq 10$  mS/cm usando Tris 25 mM (pH 8,0) antes de ser carregada em uma coluna de troca de ânions (XK 50/30, GE Healthcare), empacotada com aproximadamente 412 mL de resina MacroPrep<sup>TM</sup>-HQ que foi pré-equilibrada com Tris 25 mM (pH 8,0). A fração de fluxo de passagem foi descartada e a coluna MacroPrep<sup>TM</sup>-HQ foi lavada com 4 volumes de coluna de um tampão de lavagem contendo NaCl 90 mM, Tris 50

mM, EACA 20 mM (pH 8,0). Sob estas condições cromatográficas, a fração inicial de fluxo de passagem e as frações de lavagem contêm predominantemente plasminogênio e t-PA, enquanto o fibrinogênio permaneceu ligado à resina cromatográfica. A forma monomérica do fibrinogênio foi seletivamente eluída da coluna MacroPrep<sup>TM</sup>-HQ usando um tampão de eluição compreendendo NaCl 200 mM, Tris 10 mM, citrato trisódico 10 mM, sacarose 46 mM CaCl<sub>2</sub> 1,1 mM (pH 7,0), deixando os agregados de fibrinogênio e proteínas de baixo peso molecular ligadas à resina MacroPrep<sup>TM</sup>-HQ.

[0173] Os intermediários de produto gerados a partir do crioprecipitado solubilizado através do eluato da cromatografia em MacroPrep<sup>TM</sup>-HQ foram caracterizados para os níveis de fibrinogênio, t-PA, plasminogênio, fibronectina e fator II e para as recuperações da etapa de processamento para cada uma destas proteínas nos vários estágios do processo. Os resultados são mostrados na Tabela 3, que representa um valor médio destes três lotes de consistência em escala laboratorial separados. A recuperação do processo total para o fibrinogênio e proteínas co-purificadas começando com o crioprecipitado do plasma através do eluato de MacroPrep<sup>TM</sup>-HQ é mostrada na Figura 5.

[0174] A pureza do fibrinogênio que foi recuperado da resina cromatográfica MacroPrep<sup>TM</sup>-HQ foi maior que 95%, conforme revelado por cromatografia por HPLC de exclusão de tamanho analítica. Uma representação do perfil de HPLC do fibrinogênio analisado em TSKGel<sup>TM</sup> G4000SWXL (Tosoh Corporation) é mostrada na Figura 6. Conforme mostrado na figura 6, o monômero de fibrinogênio é eluído em um tempo de retenção de aproximadamente 17,4 minutos e contribuiu para 96,6% da área de pico total, enquanto o dímero de fibrinogênio e/ou outras proteínas de alto peso molecular são eluídas em um tempo de retenção de aproximadamente 14,8 minutos.

[0175] Adicionalmente, os lotes de fibrinogênio foram fabricados

em escala piloto (81 kg de equivalente de plasma) de acordo com o processo descrito nos exemplos 5 e 6. As características das preparações de fibrinogênio são fornecidas na tabela 4.

***Exemplo 7 – Filtração viral do fibrinogênio purificado***

[0176] A capacidade de filtração através de um filtro de vírus de 20nm foi examinada para preparações de fibrinogênio obtidas de acordo com o método do exemplo 6 em que a etapa de eluição em MacroPrep<sup>TM</sup>-HQ usou NaCl 190mM (21,5mS/cm), NaCl 200mM (22,5 mS/cm), NaCl 210mM (23,5 mS/cm) ou um tampão de NaCl 200mM contendo 1% (p/p) de arginina (25 mS/cm).

[0177] O método envolveu formular as preparações com 3 % (p/p) de arginina a um pH de cerca de 7,5 (a concentração de proteína das amostras foi de aproximadamente 6 g/L). As preparações formuladas foram então filtradas usando um filtro de 0,1µm antes da etapa de filtração do vírus. A etapa de filtração do vírus foi executada usando um filtro Pall SV4<sup>TM</sup> de 47mm em modo terminal usando uma pressão constante de 1,8 bar. Os resultados indicam que as preparações de fibrinogênio obtidas a partir da coluna MacroPrep<sup>TM</sup> HQ usando 190mM, 200mM ou 210mM resultam em características de filtração similares. Em contrapartida, a preparação de fibrinogênio eluída da coluna MacroPrep<sup>TM</sup> HQ usando tampão de NaCl 200mM contendo 1% (p/p) de arginina sujou rapidamente o filtro (figura 7).

***Exemplo 8 – Estudo de estabilidade***

[0178] A solução de fibrinogênio purificada recuperada pelo método descrito no Exemplo 5 acima foi filtrada de forma estéril e submetida a um estudo de estabilidade ao longo de um período de 9/7 semanas a 2°-8°C ou 30°C. A preparação de fibrinogênio líquida colocada a 2° a 8°C reteve cerca de 90% de sua atividade original, conforme medido pelo método de Clauss após o período de armazenamento de 9 semanas. A preparação de fibrinogênio líquida colocada a 30°C reteve

cerca de 70% de sua atividade original após o período de armazenamento de 2 semanas e não perdeu atividade adicional durante pelo menos 5 semanas. Uma redução adicional na atividade para abaixo de 60% foi observada na semana 7 da incubação a 30°C. A perda da atividade de fibrinogênio a 30°C provavelmente é atribuída à desnaturação por calor, ao invés de degradação proteolítica, já que a adição de um inibidor de protease (C1 esterase) não inibe a perda de atividade do fibrinogênio ao longo do período de armazenamento de 5 semanas. Um sumário dos dados de estabilidade é fornecido na figura 8.

**TABELA 3**

Etapas de proces- samento	Proteína (mg/mL) (n=3)		Proteína coa- gulável (n=3)		Plasminogênio (n=3)		t-PA (n=3)		Fator II (n=3)		Fibronectina (n=3)	
	Conc. (mg/mL)	Recupe- ração da etapa (%)	Conc. (mg/mL)	Recupe- ração da etapa (%)	Conc. (ug/mL)	Recu- peração da etapa (%)	Conc (ng/mL)	Recupe- ração da etapa (%)	Conc. (U/mL)	Recupe- ração da etapa (%)	Conc (mg/mL)	Recupe- ração da etapa (%)
Criopreci- pitado solubiliza- do	31,0		23,5		65,44		9,00		0,280 41		8,15	
Filtrado de criopreci- pitado solubiliza- do – pós tratamento com Al(OH) <sub>3</sub>	15,8	81%	11,6	80%	39,04	96%	2,20	39%	0,000 57	0,3%	3,47	c 70%
Precipita- do de solução salina de glicina solubiliza- da	30,3	76%	27,6	95%	45,78	46%	5,55	101%	0,000 25	26,0%	3,18	37%
Fração de escoa- mento de HEA	22,7	93%	20,5	92%	2,20	6%	0,98	22%	0,000 08	39%	2,79	97%

Hypercel												
Incubação SD & Cromato- grafia em Macro- prep-HQ	7,4	80%	6,7	79%	0,04	5%	0,13	38%	<0,00 002	0%	0,09	8%

**TABELA 4**

<b>Nº do lote</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
% de proteína coagulável	96	94	95	94
tPA por mg de proteína (rg/mg)	12	24	17	21
Plasminogênio por mg de proteína (ng/mg)	5	6	5	6
Fator II por mg de proteína (IU/mg)	$3,3 \times 10^{-7}$	$3,9 \times 10^{-7}$	$5,5 \times 10^{-7}$	$9,6 \times 10^{-7}$

***Exemplo 9 – Redução dos níveis plasmáticos de protease em uma solução contendo fator VIII e/ou VWF usando HEA Hypercel***

[0179] Este exemplo demonstra que a etapa de cromatografia de HCIC também pode ser empregada para reduzir as proteases em preparações contendo fator VIII e/ou VWF. O método envolveu clarificar a solução contendo fibrinogênio obtida no exemplo 4 usando um filtro profundo antes, e então passar a solução clarificada através de uma segunda resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica (HCIC). A etapa de HCIC foi operada sob condições para permitir as proteases, como plasminogênio, se ligarem à resina, enquanto que o fator VIII e VWF foram capazes de passar através da resina. Em parti-

cular, uma coluna XK 50/30 foi empacotada com 340 mL de resina HEA Hypercel™. A coluna foi pré-equilibrada em Tris 50mM pH 6,7. A solução de fibrinogênio clarificada preparada de acordo com o exemplo 4 foi, então, carregada na coluna e a coluna foi lavada com Tris 50mM pH 6,7. A fração de escoamento foi coletada e os níveis de fator VIII, VWF, plasminogênio e t-PA determinados (VWF:RCo = cofator da Ristocetina de Von Willebrand). Um resumo dos resultados médios obtidos a partir de testes 4 individuais é fornecido na tabela 5. Os resultados indicam que a etapa cromatográfica de HCIC removeu de maneira eficaz proteases como plasminogênio e tPA da fração compreendendo o fator VIII e VWF. Além disso, boas recuperações de fator VIII e VWF foram observadas.

**TABELA 5**

	Volume (mL)	Fator VIII (IU/mL)	VWF:RCo (IU/mL)	Plasminogênio (ng/mL)	t-PA (rg/mL)
Pré HEA Hypercel	3377,7	10,9	11,9	28617,1	2957,4
Pós fração de escoamento de HEA Hypercel	3949,3	8,7	10,6	1874,0	683,5
% de recuperação na fração de escoamento		93%	104%	8%	27%

***Exemplo 10 – Estudo comparativo do fibrinogênio purificado a partir de diferentes métodos***

[0180] A preparação de fibrinogênio fabricada de acordo com o método da presente invenção, conforme descrito no exemplo 6, foi

comparada às preparações de fibrinogênio produzidas pelos métodos descritos em WO2001048016, WO2012038410 e WO2013135684.

(a) Preparação de fibrinogênio produzida por uma modalidade preferencial dos métodos descritos em WO2001048016.

[0181] Resumidamente, o método envolveu suspender a pasta da fração I no tampão de extração (NaCl 0,8M, EACA 5mM (ácido épsi-lon-aminocaproico), Na-citrato 20 mM, 60 IU/mL de heparina, pH 7,3) (1g de fração I para 8,33 g de tampão de extração). A solução foi, então, misturada a 37°C durante 1,5 horas antes de 50 g de uma solução de 2% de Al(OH)<sub>3</sub> (Alhydrogel) ser adicionada por grama de fração I (10,8%). A mistura foi agitada durante 15 minutos à temperatura ambiente e, então, centrifugada a 5.000g durante 10 minutos com o pélete descartado. O sobrenadante tratado com Alhydrogel foi adicionado a um tampão de glicina/NaCl (glicina 2,1M, Na-citrato 20 mM, NaCl 3,6M e CaCl<sub>2</sub> 2,4mM) (ambas as soluções foram pré-equilibradas a 30°C). A adição do sobrenadante ao tampão foi completada em cerca de 4,5 minutos (1 parte de sobrenadante a 2,05 partes de tampão). A mistura foi então agitada durante 20 minutos a 30°C antes de ser centrifugada durante 10 minutos a 5010g (o sobrenadante foi descartado). O precipitado foi, então, ressolvabilizado em tampão D (NaCl 100mM, CaCl<sub>2</sub> 1,1mM, Na-citrato 10mM, tris 10mM, sacarose 45mM, pH 6,9) à temperatura ambiente com mistura durante 2 horas (1/3 do volume usado para ressuspender a fração I) (Exemplo 1, seções 1.1.1 a 1.1.6, WO0148016). A solução contendo fibrinogênio ressolvabilizada foi, então, carregada em uma coluna MacroPrep™ HQ (XK26 com altura de leito de 20cm). A coluna foi pré-equilibrada com pelo menos 1,5 volumes de coluna (CV) de tampão MQ (Tris 50mM, NaCl 100mM, EACA 20mM, pH 8,0 a 10mL/min (113 cm/h). O equilíbrio foi continuado até a coluna pós condutividade ser 90 a 110% do tampão preparado. A solução de fibrinogênio foi, então, carregada na coluna e a coluna foi la-

vada com 6 CV de tampão MQ. O fibrinogênio foi eluído como um único pico usando tampão ME (NaCl 500mM, CaCl<sub>2</sub> 1,1 mM, Na-citrato 10mM, Tris 10mM e sacarose 45mM, pH 7,0). A coluna pode ser regenerada usando 2CV de NaCl 1M (Exemplo 2, WO2001048016).

(b) Preparação de fibrinogênio produzida por uma modalidade preferencial dos métodos descritos anteriormente em WO2012038410 e WO2013135684.

[0182] O crioprecipitado, produzido a partir de plasma por métodos estabelecidos, foi reconstituído ou solubilizado em torno de pH neutro, submetido a adsorção com Al(OH)<sub>3</sub> e o gel resultante foi removido por centrifugação. O sobrenadante foi, então, submetido à inativação viral por tratamento com solvente/detergente (S/D). Os compostos S/D, Triton e TnBP foram extraídos com óleo vegetal e a fase aquosa foi colocada em contato com Fractogel® EMD-TMAE. As condições cromatográficas (valor de pH de 6,9 a 7,1 e uma osmolalidade de 570 a 610 mosmol/1) foram empregadas sob as quais o fibrinogênio não se ligou ao gel e, portanto, foi encontrado no fluxo de passagem ou sobrenadante. A solução de fibrinogênio não ligado foi agitada durante cerca de 90 minutos após a adição de glicina (concentração final de 1mol/l e pH=7,4) na presença de EDTA 20mM para precipitar o fibrinogênio. O precipitado contendo fibrinogênio foi, então, separado por centrifugação, gerando uma pasta de fibrinogênio intermediária. A pasta de fibrinogênio intermediária foi ressuspensa em tampão Tris 20mM (pH= cerca de 8,0). A suspensão obtida foi, então, filtrada e submetida a ultra/diafiltração. A solução contendo fibrinogênio resultante foi, então, carregada em GigaCap Q-650M® e o gel ou resina cromatográfica foi pré-equilibrada com o mesmo tampão Tris usado para a ressuspensão antes da aplicação da solução de fibrinogênio. As substâncias ligadas de maneira frouxa foram removidas por lavagem com o tampão de equilíbrio seguido de lavagem com um tampão de lavagem (1,5 g/l de

citrato de sódio, 6,0 g/l de cloreto de sódio, ajustado para cerca de pH=7,0 e uma condutividade de cerca de 12,0 mS/cm). O fibrinogênio foi, então, eluído da coluna de cromatografia com um tampão de eluição (1,5 g/l de citrato de sódio, e 10,0 g/l de glicina ajustado para o mesmo pH que o tampão de lavagem e ajustado com cerca de 7,0 g/l de NaCl para uma condutividade de 13,1 a 15 mS/cm.).

[0183] As soluções contendo fibrinogênio obtidas a partir dos métodos descritos em WO2001048016, WO2012038410 e WO2013135684 foram testadas para os níveis de proteína total (Biuret), fibronectina e plasminogênio. Além disso, as amostras foram colocadas em um teste de estabilidade a 2 a 8°C e 30°C.

[0184] Uma comparação das propriedades das preparações de fibrinogênio é fornecida na Tabela 6. Os resultados dos estudos indicam que o fibrinogênio fabricado a partir dos métodos da presente invenção contém teores mais baixos de plasminogênio em comparação aos outros métodos.

**TABELA 6**

Preparações de fibrinogênio	Método do exemplo 6	Método de WO2001048016	Método de WO2012038410 / WO2013135684
Fibronectina (μg/mg de proteína)	12	11	0,09
Plasminogênio (ng/mg de proteína)	5	54	791

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para reduzir o nível de ao menos uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) em uma solução compreendendo uma proteína selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) passar uma matéria-prima que compreende fibrinogênio, através de uma resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica sob condições selecionadas para que uma proteína, selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s), presente na matéria-prima seja ligada à resina; e

(ii) recuperar uma solução que compreende fibrinogênio, que passa através da resina, em que a concentração de uma proteína selecionada do grupo que consiste em plasminogênio, ativador do plasminogênio tecidual e outra(s) protease(s) na solução é reduzida em 50% ou mais em comparação à matéria-prima, em que a resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica é equilibrada a um pH de 6,5 a 8,5 antes de passar a matéria-prima e / ou solução compreendendo o fibrinogênio através da indução de carga hidrofóbica resina cromatográfica.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende, ainda, passar a solução compreendendo fibrinogênio recuperada na etapa (ii) através de uma resina cromatográfica de troca de ânions.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a solução compreendendo fibrinogênio é passada através da resina cromatográfica de troca de ânions na presença de 150mM a 270mM de NaCl.

4. Método, de acordo com a reivindicação 2 e 3,

caracterizado pelo fato de que o fibrinogênio é eluído da resina cromatográfica de troca de ânions com um tampão de eluição compreendendo de 150mM a 300mM de NaCl.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a matéria-prima é submetida a uma etapa de inativação viral antes da etapa (i).

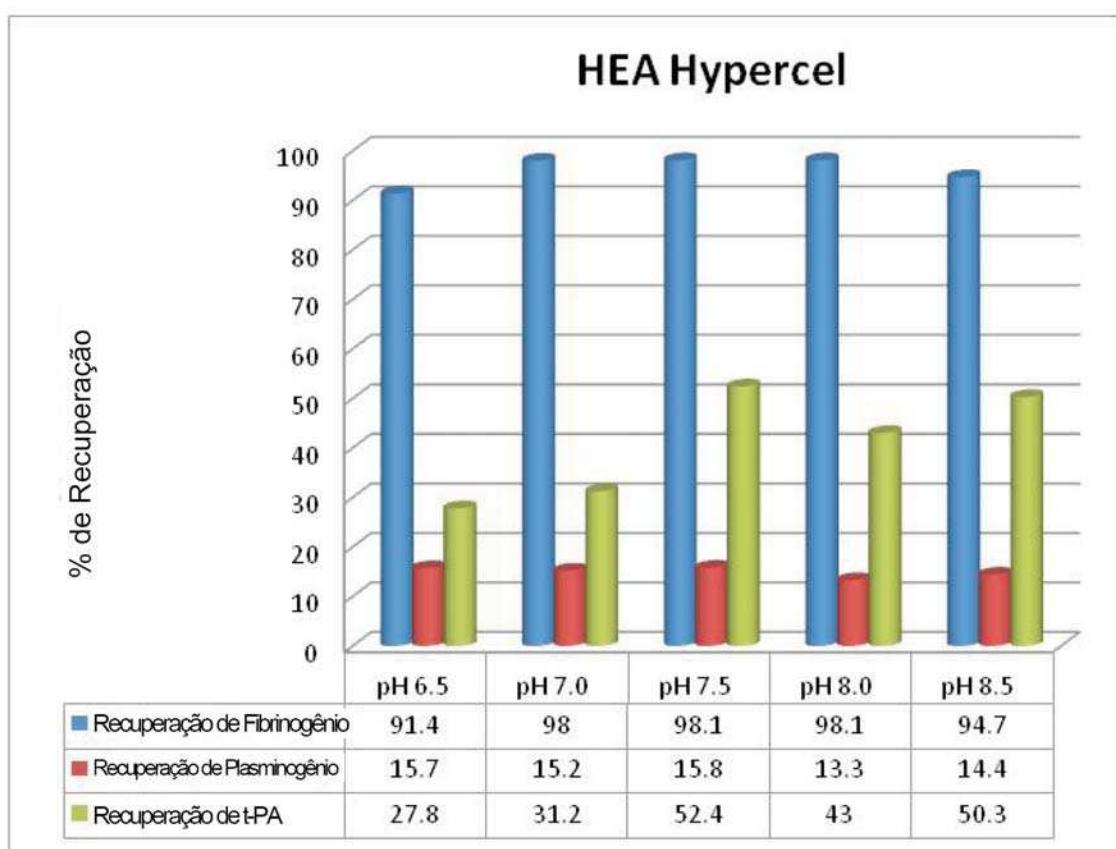
6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a solução compreendendo fibrinogênio recuperada da resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica, é submetida a uma etapa de inativação viral.

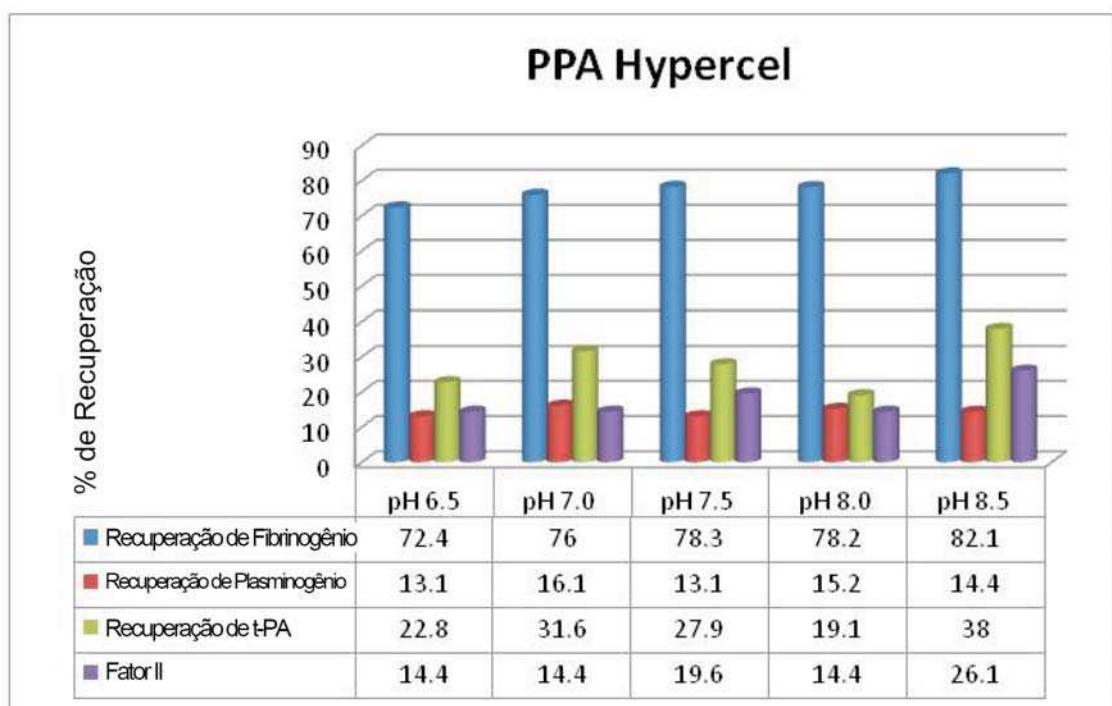
7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a matéria-prima é um crioprecipitado de plasma solubilizado.

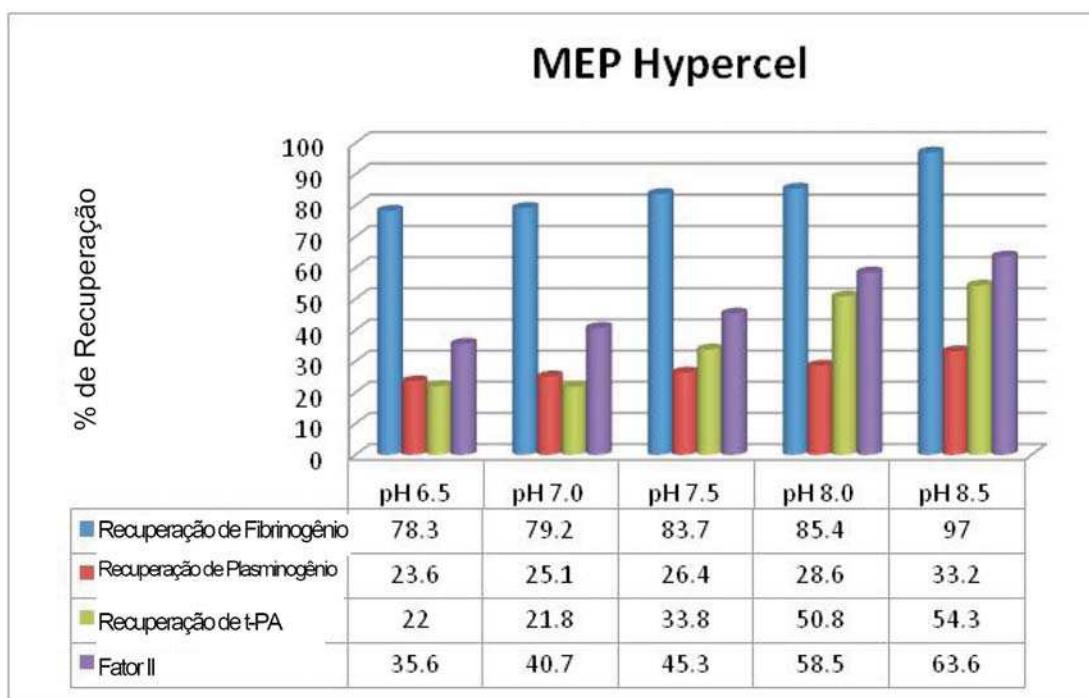
8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que, antes da etapa (i), proteínas dependentes de vitamina K são removidas ou reduzidas da matéria-prima.

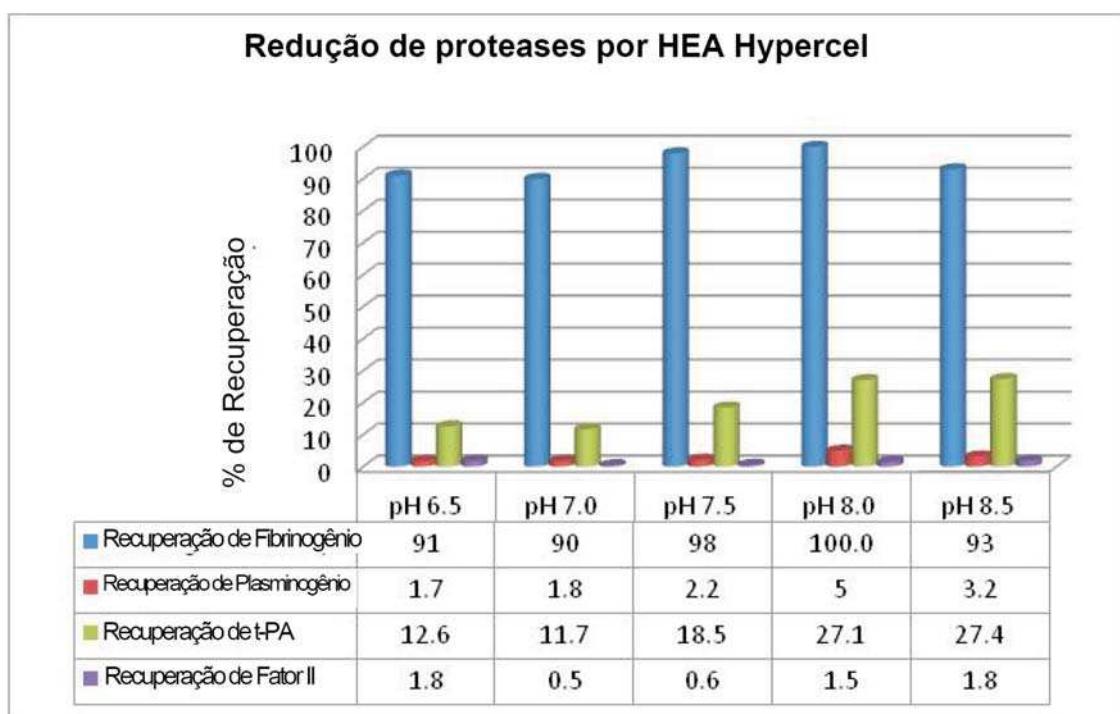
9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a matéria-prima ou solução compreendendo fibrinogênio que é passada através da resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica tem um pH de 6,5 a 8,5.

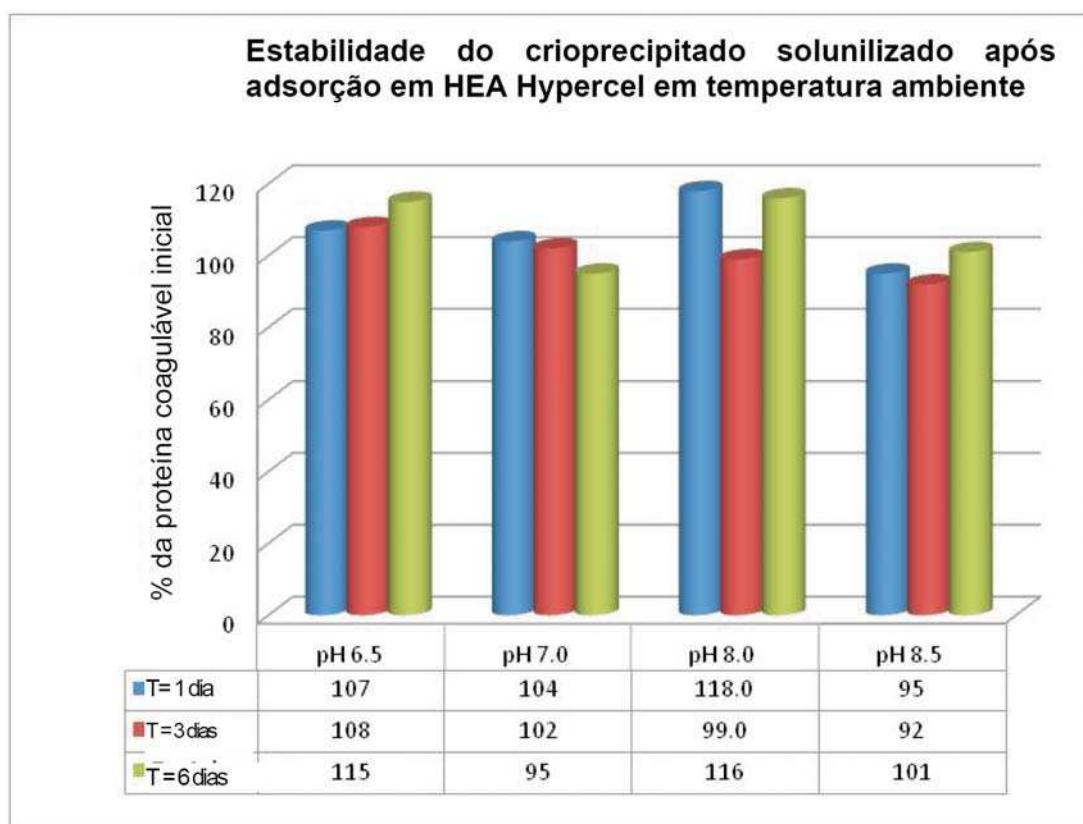
10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a resina cromatográfica de indução de carga hidrofóbica compreende um ligante selecionado do grupo que consiste em mercaptoetilpiridina, n-hexilamina e fenilpropilamina.

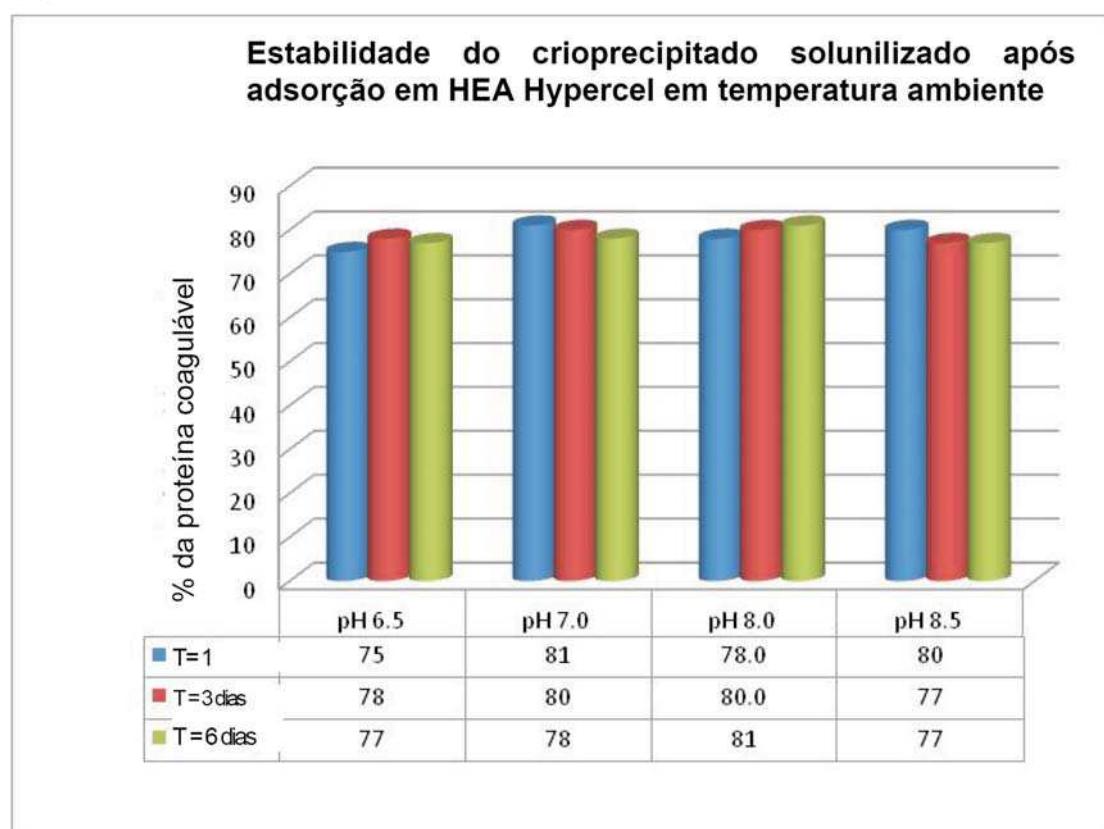
**Figura 1**

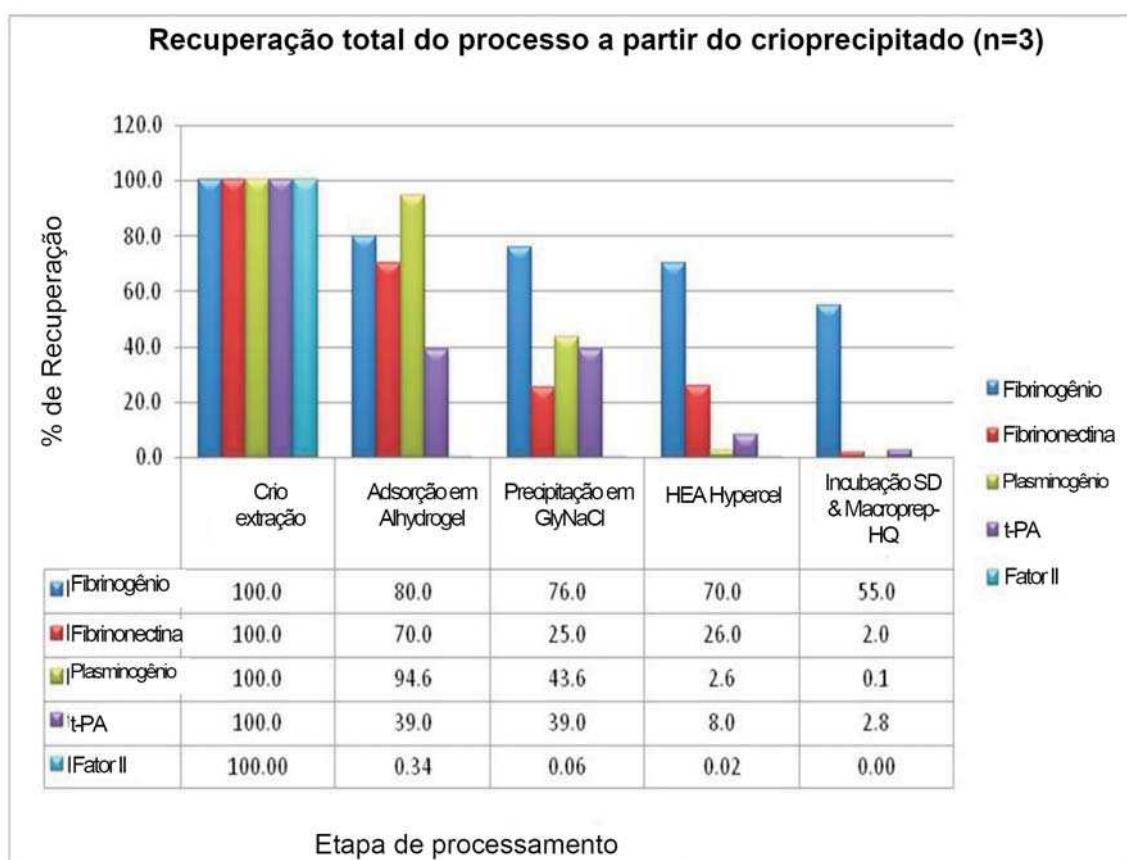
**Figura 2**

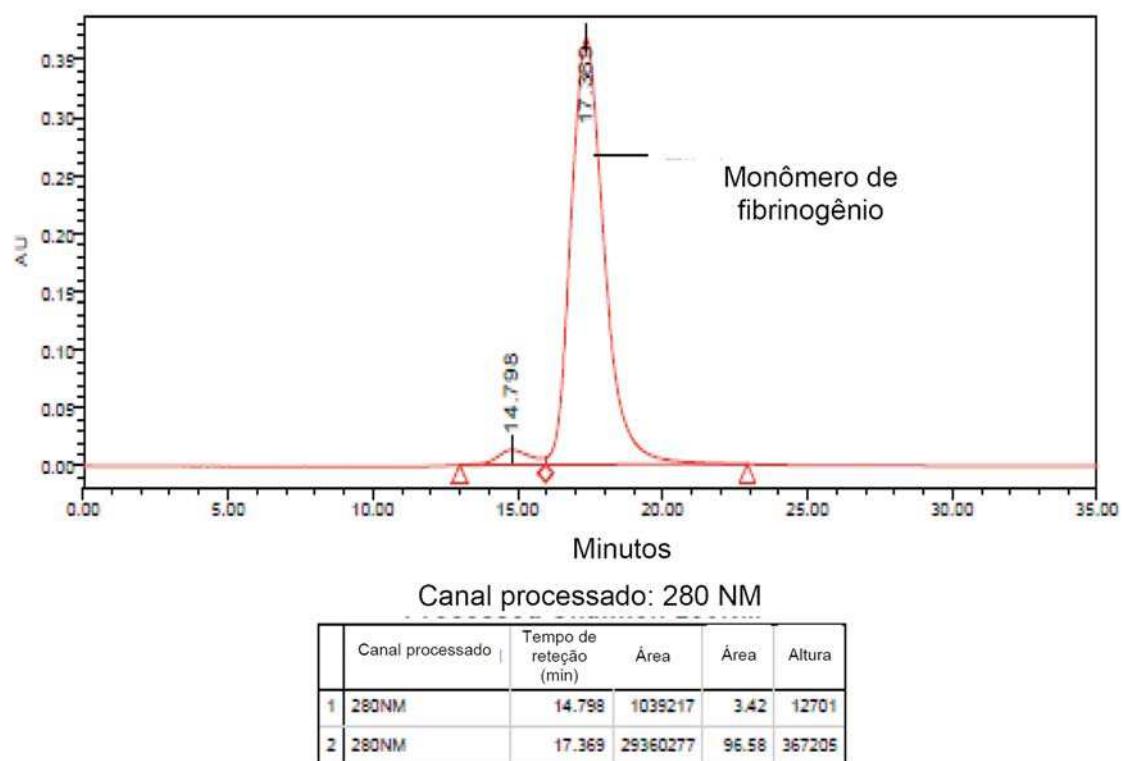
**Figura 3**

**Figura 4a**

**Figura 4b**

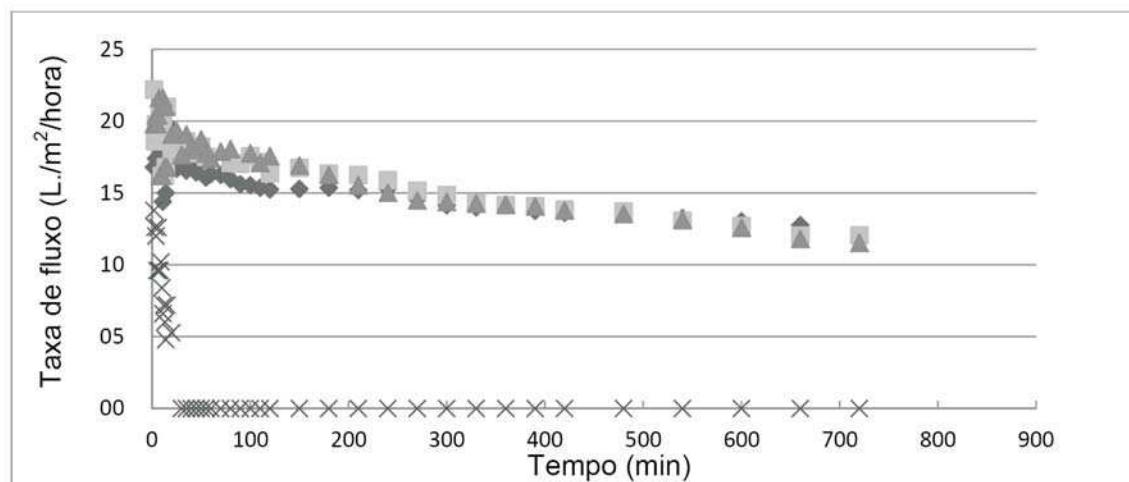
**Figura 4c**

**Figura 5**

**Figura 6**

9/10

**Figura 7**



**Figura 8**

