

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 934**

51 Int. Cl.:

A61K 38/36 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61L 2/00 (2006.01)

C07K 14/75 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04767620 .0**

96 Fecha de presentación: **08.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1648496**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

54 Título: **Procedimiento de estabilización de un crioprecipitado de proteínas plasmáticas destinado a someterse a un tratamiento térmico de inactivación viral**

30 Prioridad:
09.07.2003 FR 0308403

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.06.2012

73 Titular/es:
**LABORATOIRE FRANCAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
ZONE D'ACTIVITE DE COURTABOEUF, 3,
AVENUE DES TROPIQUES
91940 LES ULIS, FR**

72 Inventor/es:
**BARDAT, Annie y
BEGIN, Edith**

74 Agente/Representante:
Sugrañes Moliné, Pedro

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

ES 2 382 934 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de estabilización de un crioprecipitado de proteínas plasmáticas destinado a someterse a un tratamiento térmico de inactivación viral

5

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de proteínas crioprecipitables derivadas del plasma sanguíneo, en general mediante crioprecipitación o precipitación con alcohol en frío, que comprende una etapa de liofilización y una etapa posterior de inactivación viral mediante tratamiento térmico del liofilizado, que comprende una etapa de adición de una formulación estabilizadora y solubilizadora que permite una liofilización de las composiciones líquidas de dichas proteínas y una fácil disolución de las formas liofilizadas posterior al tratamiento térmico de inactivación viral. En el marco de la invención, el término "proteína" abarca la proteína como tal y también los concentrados y las fracciones que contienen esta proteína, sola o mezclada con otras proteínas, fundamentalmente para uso terapéutico. Estos concentrados y fracciones se obtienen por métodos de fraccionamiento del plasma humano o animal conocidos en la técnica anterior. Asimismo, la expresión "composición líquida de proteínas crioprecipitables" designa una composición líquida que comprende al menos una proteína caracterizada por su insolubilidad en frío durante la descongelación de un plasma humano o animal congelado, o bien, por su insolubilidad en una precipitación mediante la adición al plasma de un solvente orgánico como el etanol, en frío.

10

La utilización de productos terapéuticos derivados del plasma humano, como los factores de la coagulación, con fines terapéuticos, fundamentalmente en el caso de trastornos hemorrágicos hereditarios como la hemofilia, puede verse muy comprometida por el gran riesgo que presenta para el paciente la presencia de virus en los productos sanguíneos. A pesar de que los donantes individuales se seleccionan de manera rigurosa, sigue habiendo un riesgo de transmisión de diversos virus, fundamentalmente los de la hepatitis y el SIDA, y de virus desconocidos hasta este momento que pueden revelarse transmisibles a través de los productos sanguíneos.

20

Por consiguiente, debe evitarse la transmisión viral mediante tratamientos adecuados de las diferentes fracciones purificadas derivadas del plasma de los donantes y destinadas a un uso terapéutico. A este respecto, se conocen diversos métodos de inactivación o de eliminación viral aplicados a diversas fracciones proteínicas derivadas del plasma sanguíneo. Por ejemplo, podemos mencionar los tratamientos con solvente-detergente, ultrafiltración y nanofiltración, la pasteurización o el calentamiento prolongado. El calentamiento prolongado suele aplicarse únicamente a fracciones de proteínas del plasma previamente liofilizadas que requieren temperaturas de calentamiento de al menos 70 °C en lapsos de tiempos comprendidos entre 50 y 100 horas para lograr una inactivación viral óptima. No obstante, en tales condiciones extremas de tratamiento térmico, las proteínas plasmáticas, frágiles y termolábiles sufren degradaciones, provocando disminuciones importantes de sus funciones biológicas.

30

Para solucionar este inconveniente, se añaden previamente excipientes protectores y estabilizadores de proteínas plasmáticas a las composiciones proteínicas líquidas antes de la liofilización para responder a un doble objetivo conjunto. El primer objetivo responde a la necesidad de una estabilización, por un lado, de las proteínas consideradas durante la liofilización y, por otro lado, de las proteínas liofilizadas durante el almacenamiento. El segundo objetivo corresponde a la necesidad de proteger las proteínas liofilizadas durante el tratamiento térmico de inactivación viral.

40

La patente EP 0 094 611 describe un método de calentamiento de fracciones proteínicas liofilizadas del plasma, el factor VIII o el fibrinógeno, que consiste en someter el producto seco a una temperatura de calentamiento de 60 °C, durante 72 a 96 horas. Esta patente no menciona ninguna composición particular de excipientes estabilizadores durante el tratamiento térmico.

45

La patente canadiense 1 260 389 menciona la incorporación de excipientes, como los aniones no polares de masa molecular superior a 80, los azúcares, los azúcares reductores y, fundamentalmente, los aminoácidos, en composiciones líquidas de proteínas del plasma antes de la liofilización para conferirles una estabilización en calentamiento en seco durante aproximadamente 72 horas, a 68 °C. Sin embargo, la asociación de azúcares reductores con aminoácidos deriva en compuestos de Maillard cuyas propiedades no favorecen la buena inocuidad de las proteínas tratadas (actividad, inmunogenicidad, alergias, etc.) Este tratamiento necesita realizarse al vacío o en atmósfera inerte.

50

La mayoría de los excipientes estabilizadores pueden revelarse protectores de fracciones de proteínas plasmáticas durante el tratamiento térmico en seco de las mismas, a temperaturas del orden de 60-68 °C durante 30 a 96 horas (P. Thomas, British Journal of Haematology, 70, 1998, 393-395 y J.A. Levy et al., The Lancet, June 22, 1985, 1456-1457). No obstante, a pesar de que la carga viral disminuye después de un tratamiento en esas condiciones, se demostró que podían transmitirse infecciones tales como HIV, HBV, HBC y parvovirus B19 (P. Thomas mencionado anteriormente). Para eliminarlos de modo eficaz, se propuso calentar las fracciones de proteínas plasmáticas liofilizadas a temperaturas más elevadas. De este modo, S.J. Skidmore et al. (Journal of Medical Virology, 30, 1990, 50-52) demostraron que un tratamiento térmico de concentrados de factor VIII liofilizados, a una temperatura de 80

60

65

°C durante 72 horas, evita la transmisión del virus VHC no-A y no-B. La patente US 5 831 027 describe un procedimiento de tratamiento térmico de una proteína liofilizada derivada del crioprecipitado de plasma sanguíneo, el fibrinógeno, a una temperatura de 80 °C durante 72 horas, que permite la obtención del fibrinógeno exento de eventuales virus tales como los de VHB, HBC o el parvovirus B19. Los excipientes estabilizadores agregados para proteger la composición de fibrinógeno tanto durante la liofilización como durante el tratamiento térmico de inactivación viral, comprenden sacarosa y/o un aminoácido (arginina), tampón tris y citrato de sodio L. Wilkelman et al. (Virus Inactivation in Plasma Products., Curr.Stud Hematol Blood Transfus., Basel, Karger, 1989, N°56, 55-69) también demuestran la necesidad de agregar excipientes al factor VIII antes de la liofilización y al tratamiento térmico de inactivación viral, a 80 °C durante, 72 horas. Los excipientes descritos son: NaCl, citrato de sodio, Tris, CaCl₂ y sacarosa.

Por otra parte, dado que las diferentes proteínas derivadas del fraccionamiento del plasma, que se sometieron a una liofilización y a un tratamiento térmico de inactivación viral, requieren una reconstitución en un medio adecuado antes de su utilización clínica, la misma debe poder aplicarse fácilmente en un lapso de tiempo relativamente corto, según la exigencias recomendadas por la Farmacopea Europea. A este respecto, estudios sobre la estabilidad térmica del factor VIII en un crioprecipitado liofilizado (J. Margolis et al., The lancet, December 8, 1984, 1345) que contiene, antes de la liofilización, una mezcla de aminoácidos naturales apropiada para una nutrición parenteral, el Synthamin 17% (Travenol Laboratories Ltd.), demostraron que un tratamiento a 80 °C durante 16 horas, no sólo provocaba una degradación del factor VIII, ya que su actividad era nula, sino también la imposibilidad de volver a disolver el crioprecipitado después de las operaciones consideradas. La patente US 5 399 670 describe un procedimiento para facilitar la solubilización o la reconstitución de las composiciones del complejo de factor VIII liofilizado con agua purificada para inyección, que comprende una etapa de adición de arginina a una solución de factor VIII, antes de su liofilización. Esta patente no menciona ningún tratamiento de inactivación viral. Según esta patente, también puede preverse la adición de histidina y de albúmina. Los excipientes estabilizadores mencionados en la patente US 5 831 027, anteriormente mencionada, también están destinados a favorecer la disolución del fibrinógeno liofilizado en agua pura, antes de su uso terapéutico.

Sin embargo, la elección de una formulación estabilizadora está marcada por la especificidad de las proteínas plasmáticas. De este modo, en referencia al artículo de N. Heimburger et al. (Virus Inactivation in Plasma Products., Curr Stud Hematol Blood Transfus., Basel, Karger, 1989, N°56, 23-33), suele considerarse que una formulación estabilizadora específica sólo puede ser útil para una fracción proteínica con los principios activos dados. En caso de tratarse de fracciones proteínicas más complejas, fundamentalmente aquellas en las que se consideran todas las proteínas de la coagulación y de la hemostasia derivadas de un fraccionamiento del plasma, surge una dificultad adicional. Por otra parte, los hidratos de carbono, fundamentalmente la sacarosa, pueden utilizarse de modo eficaz como excipientes de estabilización y redisolución de fracciones proteínicas del plasma, cuando se quiere liofilizar las fracciones consideradas y tratarlas con calor en seco; aunque esto tiene un efecto moderador sobre la inactivación viral (N. Heimburger et al., mencionado anteriormente). En consecuencia, las fracciones proteínicas tratadas de este modo pueden no estar totalmente exentas de virus, restringiéndose su uso en el ámbito clínico. Además, algunos hidratos de carbono, como la maltosa o la sacarosa, no pueden utilizarse sin riesgo en personas que presentan insuficiencias renales y/o sufren de diabetes.

En consecuencia, teniendo en cuenta la necesidad médica que existe para algunas proteínas responsables de la coagulación y la hemostasia, en particular, las proteínas crioprecipitables, la solicitante procuró desarrollar una formulación simple, exenta de hidratos de carbono y de tampón tris, compatible con un uso terapéutico que, agregada a composiciones líquidas de proteínas crioprecipitables, confiere una buena protección de todos los principios activos considerados durante y después de la liofilización de estas así como contra los choques térmicos necesarios para la destrucción de los virus y que, al mismo tiempo, permite acortar el tiempo de disolución de las formas liofilizadas de estas proteínas.

Con tal fin, considerando que la adición de arginina a composiciones líquidas de proteínas crioprecipitables ofrece un efecto protector durante y después de su liofilización, permitiendo la solubilización de sus formas liofilizadas pero sin garantizar su estabilidad durante el tratamiento térmico de inactivación viral, la solicitante buscó diferentes compuestos, solos o mezclados que, con la adición de arginina, ofrecerían una protección contra la desnaturalización térmica. Así, la solicitante demostró, de modo sorprendente, que agregar a la arginina, aminoácido muy hidrófilo, al menos un aminoácido hidrófobo, de preferencia elegido entre los más hidrófobos según Kyte et al. (J. Mol. Biol., 157, 105-132, 1982), y citrato trisódico, permitía estabilizar proteínas crioprecipitables durante y después de la liofilización, mejorando notablemente la solubilización de las formas liofilizadas después del tratamiento térmico de inactivación viral.

En consecuencia, la invención se refiere a un procedimiento de obtención de proteínas crioprecipitables, que comprende una etapa de inactivación viral mediante tratamiento térmico de un liofilizado de dichas proteínas, caracterizado porque comprende, antes de que las proteínas se transformen en liofilizado, una etapa inicial de adición de una formulación estabilizadora y solubilizadora que comprende una mezcla de arginina, de al menos un aminoácido hidrófobo y citrato trisódico a dichas proteínas.

Así, la adición de la formulación estabilizadora y solubilizadora en el procedimiento según la invención permite que las proteínas crioprecipitables a partir del plasma sanguíneo conserven una actividad biológica satisfactoria después de la liofilización y el tratamiento térmico de inactivación viral, incluso si este es severo, y presenten un tiempo de disolución reducido conservando la limpidez en la solución del liofilizado reconstituido. Esta formulación presenta, además, la ventaja de ser simple, universal y de poder aplicarse fácilmente en el ámbito industrial, con ganancias de tiempo considerables.

De preferencia, la formulación estabilizadora y solubilizadora utilizada en el procedimiento de la invención está constituida solo por la mezcla de arginina, con al menos un aminoácido hidrófobo y citrato trisódico. Una formulación de este tipo, exclusivamente constituida por estos tres compuestos, presenta, particularmente, la ventaja de combinar la disminución de las duraciones con los costes de preparación a escala industrial, gracias a la presencia de un número mínimo pero eficaz de adyuvantes.

En el marco de la invención, resulta útil cualquier aminoácido hidrófobo (según Kyte et al., mencionado anteriormente), como la valina y la fenilalanina pero, de manera ventajosa, se elige la leucina, la isoleucina o una mezcla de las dos.

La formulación estabilizadora y solubilizadora también comprende citrato trisódico que permite, por un lado, ajustar el pH de las composiciones líquidas de proteínas crioprecipitables antes de los tratamientos mencionados anteriormente y, por otro lado, incrementar el efecto protector de esta, siempre y cuando se ajuste su concentración.

Por último, también puede agregarse glicina o lisina a la formulación estabilizadora y solubilizadora.

De ser necesario, también pueden agregarse adyuvantes estabilizadores conocidos en la técnica.

En el contexto de la invención, se puede agregar la formulación estabilizadora y solubilizadora que comprende la mezcla de los tres compuestos de interés a una composición líquida de proteínas crioprecipitables, o las proteínas crioprecipitables pueden disolverse en una solución acuosa de la formulación que comprende la mezcla de los tres compuestos de interés.

El experto en la materia elegirá las concentraciones de los diferentes aditivos considerados para la formulación estabilizadora con el fin de obtener el efecto de estabilización deseado. De modo ventajoso, en cada uno de los aditivos, las concentraciones por litro de composiciones líquidas de proteínas crioprecipitables son las siguientes:

- arginina, de 25 a 50 g/l y, de preferencia, de 35 a 45 g/l (en referencia a la patente US 5 399 670);
- citrato trisódico, de 0,5 a aproximadamente 12 g/l;
- leucina, isoleucina o su mezcla, de 5 a 15 g/l y, de preferencia, de 9 a 11 g/l; y
- glicina y/o lisina, cada una de 1 a 5 g/l y, de preferencia, cada una de 1,5 a 2,5 g/l.

En el marco de la invención, la liofilización de composiciones líquidas de proteínas previamente congeladas se realiza según los métodos clásicos, utilizando dispositivos habituales, según las condiciones de aplicación conocidas por el experto en la materia. De manera ventajosa, la liofilización se realiza a temperaturas comprendidas entre -40 y -30 °C, durante aproximadamente 48 horas.

El tratamiento térmico de inactivación viral se realiza con el fin de inactivar eficazmente los virus. De preferencia, se aplica a temperaturas comprendidas entre 80 y 90 °C, durante 72 horas.

Aunque el tratamiento térmico de inactivación viral permite la obtención de un liofilizado exento de virus, el procedimiento puede incluir, antes de la etapa de adición de la formulación estabilizadora y solubilizadora a una composición líquida de proteínas crioprecipitables, al menos una etapa adicional de inactivación y/o de eliminación de los virus de dicha composición líquida con solvente-detergente y/o nanofiltración, por ejemplo, en filtros de 35 nm, para garantizar al final una inactivación y una eliminación totales y completas de los virus.

De este modo, de la aplicación del procedimiento, surgen proteínas crioprecipitables liofilizadas y viralmente inactivadas que, una vez reconstituidas en un medio líquido compatible en el ámbito farmacéutico, como el agua pura para inyección, pueden inyectarse directamente en un paciente. Esta calidad terapéutica de las proteínas crioprecipitables se obtiene gracias a la formulación estabilizadora y solubilizadora que hace posible todos los tratamientos mencionados anteriormente, fundamentalmente los tratamientos de inactivación y eliminación de los virus, conservando la actividad biológica de las proteínas crioprecipitables tratadas y las características de disolución del liofilizado.

La formulación estabilizadora y solubilizadora utilizada según el procedimiento de la invención se aplica a las proteínas crioprecipitables, como el factor VIII, el factor von Willebrand, el factor XIII, el fibrinógeno y la fibronectina, obtenidas por métodos de fraccionamiento del plasma sanguíneo conocidos por el experto en la materia. La formulación estabilizadora y solubilizadora también se aplica a los diferentes concentrados de proteínas semipurificados que se obtienen, por ejemplo, mediante extracción/solubilización en tampón tris y adsorción sobre gel de alúmina, como se describe en Wickerhauser et al. (Vox Sang., 35, 18-31, 1978). Un concentrado obtenido de

esta forma, enriquecido con factor VIII y factor von Willebrand, puede calentarse según las condiciones descritas en la patente EP 0 094 611.

5 Esta formulación también es apropiada para la estabilización y la solubilización de las proteínas purificadas o de las fracciones enriquecidas en cada uno de los factores de la coagulación tal como se obtienen, fundamentalmente, después de aplicar los métodos cromatográficos descritos, por ejemplo, en la patente EP 0 359 593, posteriormente liofilizados y sometidos a un tratamiento de inactivación viral. Por otra parte, esta formulación es apropiada para la estabilización del fibrinógeno purificado obtenido a partir del crioprecipitado de plasma o del plasma mediante precipitación alcohólica en frío, como la describió Kistler et al. (Vox Sang., 7, 1962, 414-424). Es importante destacar que, en el contexto de la invención, durante la purificación del fibrinógeno a partir de un crioprecipitado mediante cualquier técnica de fraccionamiento conocida por el experto en la materia, este siempre está acompañado de un bajo contenido en factor XIII (FXIII), no redhibitorio para su actividad terapéutica.

15 Este procedimiento es particularmente ventajoso porque puede aplicarse a todas las proteínas crioprecipitables o a al menos a una proteína elegida entre ellas y, en particular, elegida entre el factor VIII, el factor von Willebrand, el factor XIII, el fibrinógeno y la fibronectina.

20 La invención también se refiere a los concentrados de al menos una proteína crioprecipitable, fundamentalmente para uso terapéutico, que comprende la formulación estabilizadora y solubilizadora según el procedimiento de la invención.

25 Por último, la invención se refiere a una formulación estabilizadora y solubilizadora para las proteínas crioprecipitables destinadas a someterse a una liofilización y a un tratamiento térmico de inactivación viral que comprende una mezcla de arginina, con al menos un aminoácido hidrófobo y citrato trisódico. De preferencia, la formulación estabilizadora y solubilizadora está compuesta por dicha mezcla de arginina, con al menos un aminoácido hidrófobo y citrato trisódico.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, sin limitar su alcance.

30 **Ejemplo 1**

Se disolvió un crioprecipitado, constituido en gran parte por factor VIII, factor von Willebrand, factor XIII, fibrinógeno y fibronectina, en una formulación estabilizadora y solubilizadora de la invención, que comprende la mezcla de compuestos que se indican en el cuadro 1 (solución A). La concentración en proteínas es de aproximadamente 15 g/l.

35 Cuadro 1: compuestos y sus concentraciones (solución A)

Compuestos	Concentración (g/l)
Arginina	40
Isoleucina	10
Citrato trisódico	2,5
Lisina	2
Glicina	2

40 Después de homogeneizar la mezcla, se filtra la solución obtenida en filtros de 0,45 µm y se extraen y colocan 5 ml en un frasco. A continuación, se somete la solución a una liofilización a -30°C, durante 48 horas. Se procede de manera idéntica con una solución de referencia que comprende el mismo crioprecipitado que el anterior pero disuelto en una formulación estándar que comprende una mezcla de tris (2,4 g/l), citrato trisódico (5,88 g/l) y NaCl (1,16 g/l), respectivamente (solución B).

45 Después de la liofilización, los dos liofilizados de crioprecipitado obtenidos, el que contiene la formulación de la invención y el que contiene la formulación estándar, se disuelven en 5 ml de agua pura para inyección (llamados, respectivamente, solución A' y solución B'). Se procede a realizar experimentos destinados a apreciar la aptitud de las formulaciones estándar y la de la invención para proteger o estabilizar todas las proteínas consideradas durante la liofilización, y para solubilizar conjuntamente las formas liofilizadas obtenidas. A tal efecto, para cada una de las soluciones A' y B', se evalúan los siguientes tres parámetros: el aspecto del liofilizado antes de la redisolución, el tiempo de redisolución del liofilizado en el agua purificada para inyección y la turbidez de la solución obtenida, conjuntamente con las actividades y las cantidades de las diferentes proteínas mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Los diferentes resultados de las medidas se reflejan en el cuadro 2 en el que las unidades de volumen corresponden a la solución del producto liofilizado reconstituido por 5 ml de agua purificada para inyección.

55 Cuadro 2:

	Solución A'	Solución B'
Aspecto del liofilizado seco	amarillento	amarillento,

		liofilizado retractorado
Tiempo de redisolución (min)	6,58	10,72
Turbidez (NTU*)	18,1	29
Fibrinógeno coagulable (g/l)	12,6	14,5
Fibrinógeno ponderal (g/l)	11,6	11,2
Actividad en factor VIII (UI/ml)	6,7	6,3
Actividad en factor von Willebrand (FvW: Rco; UI/ml)	8,1	8,1
Actividad antigéna en factor XIII (UI/ml)	1,51	1,24
Fibronectina (mg/ml)	5,85	5,52

*NTU: Normalized Turbidity Units

5 Los resultados obtenidos demuestran, en primer lugar, que la adición de una formulación de la invención (solución A) a las proteínas del crioprecipitado, respecto de la formulación estándar (solución B), permite reducir sensiblemente el tiempo de redisolución del liofilizado, en un orden del 40 %. También se observa que la formulación A da mejores resultados en cuanto a la turbidez, lo que indica una menor presencia, respecto de la solución B, de productos de degradación insolubles en agua. En ambos casos, las soluciones A y B restituyen globalmente las mismas cantidades y actividades de las proteínas consideradas después de la liofilización.

10 **Ejemplo 2**

Los dos liofilizados de proteínas del crioprecipitado anteriores, a saber, uno con la formulación de la invención y el otro con la formulación estándar, se calientan en seco durante 72 horas, a 80 °C. El liofilizado calentado de las proteínas del crioprecipitado que comprende una formulación de la invención (solución A) se disuelve en 5 ml de agua pura para inyección (solución A"). Se observa que el liofilizado calentado de las proteínas del crioprecipitado que comprende la formulación estándar (solución B) no puede disolverse. Esta imposibilidad de redisolución se explica por la presencia de proteínas desnaturalizadas por el calor e insolubles, lo que demuestra que la solución B no estabiliza las proteínas durante el tratamiento térmico. Como en el ejemplo 1, se procede a los mismos experimentos destinados a apreciar la aptitud de la formulación de la invención para estabilizar y solubilizar, de manera conjunta, todas las proteínas consideradas después del tratamiento térmico de inactivación viral realizado en sus formas liofilizadas del ejemplo 1. Los diferentes resultados de las medidas se reflejan en el cuadro 3, en el que las unidades de volumen corresponden a la solución del producto liofilizado reconstituido, por 5 ml de agua purificada para inyección.

25 Cuadro 3:

	Solución A"
Aspecto del liofilizado seco	amarillo limón
Tiempo de redisolución (min)	3,73
Turbidez (NTU*)	18,3
Fibrinógeno coagulable (g/l)	13,3
Fibrinógeno ponderal (g/l)	11,7
Actividad en factor VIII (FvW: Rco; UI/ml)	5,6
Actividad en factor von Willebrand (FvW: Rco; UI/ml)	6,0
Actividad antigéna en factor XIII (UI/ml)	1,86
Fibronectina (mg/ml)	5,93

*NTU: Normalized Turbidity Units

30 La comparación de los resultados de las medidas obtenidas para las soluciones A' y A", extraídos de los cuadros 1 y 2, respectivamente, demuestra, de modo sorprendente, que la solución A, formulación según la invención, permite una reducción muy importante, de aproximadamente el 50 %, del tiempo necesario para la redisolución de las proteínas tratadas térmicamente respecto del obtenido después de la liofilización, sin pérdidas considerables de sus funciones biológicas.

35 **Ejemplo 3**

Un lote de fibrinógeno, aislado y purificado a partir de un crioprecipitado por el método de Kistler et al., se disuelve a razón de 15g/l en una formulación testigo compuesta por una mezcla de citrato trisódico (2,5 g/l), lisina (2 g/l) y glicina (2 g/l) (solución C). Se obtiene una solución concentrada en fibrinógeno. A esta solución se agregan diversos aminoácidos a fin de estudiar su influencia sobre el tiempo de redisolución del liofilizado de fibrinógeno antes y después del calentamiento. Las soluciones obtenidas y las concentraciones en aminoácidos se reflejan en el cuadro 4.

Cuadro 4

Solución	Aminoácido (g/l)
C	-
C1	C + valina (5 g/l)
C2	C + leucina (5 g/l)
C3	C+ arginina (10 g/l)
C4	C + isoleucina (10 g/l)
C5	C + isoleucina (10 g/l) + arginina (10 g/l)

5 A continuación, las diferentes soluciones (soluciones C a C5) se filtran y 10 ml de cada solución se someten a una liofilización y al tratamiento térmico según el ejemplo 1. Los liofilizados respectivos se vuelven a disolver en 10 ml de agua pura para inyección y se mide el tiempo necesario para una redisolución total de los liofilizados. Los resultados se presentan en el cuadro 5.

Cuadro 5

10

Solución	Tiempo de redisolución antes del calentamiento (min)	Tiempo de redisolución después del calentamiento (min)
C	32,66	61,50
C1	15,22	8,05
C2	16,3	22,93
C3	6,0	12,69
C4	11,25	10,75
C5	5,7	4,85

Los resultados demuestran que la solución C5 según la invención ofrece el tiempo más corto de redisolución.

15 Para mostrar también la aptitud de las soluciones consideradas para estabilizar el fibrinógeno durante la liofilización y el calentamiento de las formas secas, en función de la naturaleza del aminoácido agregado, se procede a realizar mediciones de turbidez de las soluciones anteriores reconstituidas. El cuadro 6 presenta las medidas de la turbidez tanto antes como después del calentamiento de los liofilizados de las soluciones C a C5.

Cuadro 6

20

Solución	Turbidez antes del calentamiento (*NTU)	Turbidez después del calentamiento (*NTU)	Incremento (%)
C	24,25	34,65	42,9
C1	18,04	22,83	26,6
C2	18,48	24,68	35,6
C3	15,44	18,80	21,8
C4	13,02	16,06	23,3
C5	10,98	11,88	8,2

(*NTU): Normalized Turbidity Units

Los resultados indican, de manera incuestionable, que una formulación de la invención (solución C5) presenta la diferencia de turbidez más baja de las soluciones reconstituidas, antes y después del calentamiento, lo que se traduce en un incremento de sólo el 8,2 %, respecto de la solución C, cuyo incremento es del 42,9 %.

25

Ejemplo 4

Las soluciones C, C3 a C5 del ejemplo 3, que contienen otro lote de fibrinógeno, se liofilizan y calientan a 80 °C, durante 72 horas. Los liofilizados correspondientes se vuelven a disolver en 10 ml de agua pura para inyección y se miden los siguientes parámetros: el tiempo de redisolución, la cantidad de multímeros no solubles, la turbidez y la filtrabilidad de las soluciones reconstituidas por métodos conocidos por el experto en la materia. En particular, la filtrabilidad permite apreciar el grado de desnaturalización de una proteína, en este caso el fibrinógeno, pero no define el o los factores de desnaturalización que pueden ser proporcionales a la cantidad de partículas, fibrillas o multímeros. Asimismo, el contenido de multímeros también es proporcional al grado de desnaturalización del fibrinógeno y se mide por electroforesis (SDS Page). El ensayo de filtrabilidad consiste en medir el volumen filtrado recuperado de una solución a través de un filtro con porosidad suficiente para garantizar la esterilización de la solución, es decir, de $0,20 \pm 0,02 \mu\text{m}$ y de 25 mm de diámetro, por medio de una jeringa que contiene 10 ml de la solución a estudiar. El volumen filtrado recuperado traduce la importancia de la obstrucción del filtro por parte de los productos de degradación. De este modo, cuanto mayor es el volumen recuperado, menos degradado está el fibrinógeno. Los resultados de las diferentes medidas se reflejan en el cuadro 7.

40

Cuadro 7

Solución	Filtrabilidad (ml)	Tiempo de redisolución (min)	Cantidad en multímeros (%)	Turbidez (*NTU)
C	7	20	10	26
C3	10	20	10	21
C4	10	10	5	11
C5	10	4	< 3	11

(*NTU): Normalized Turbidity Units

- 5 Los cuatro parámetros analizados anteriormente indican que una formulación de la presente invención (solución C5) se adapta particularmente a la estabilización y la redisolución del liofilizado de fibrinógeno calentado. El liofilizado de fibrinógeno reconstituido presenta una filtrabilidad correspondiente a la superficie del filtro de aproximadamente 2 ml/cm².
- 10 Para demostrar los poderes estabilizadores y solubilizadores de la solución C5 según la invención respecto del fibrinógeno, incluso en condiciones severas de tratamiento térmico, las soluciones C3 y C5, que contienen otro lote de fibrinógeno, se liofilizaron y calentaron a 90 °C, durante 72 horas. Aparte del estudio de los cuatro parámetros anteriores, se procedió a ensayos suplementarios que consistieron en medir la tasa de productos de degradación del fibrinógeno (PDF). En el marco de este ejemplo, los PDF (µg/ml) representan péptidos de diversos tamaños generados durante una desnaturalización del fibrinógeno. Cuanto mayor es este valor, mayor es su degradación y es susceptible de formar, por ejemplo, coágulos. Los resultados de las diferentes medidas se reflejan en el cuadro 8.
- 15

Cuadro 8

Solución	Filtrabilidad (ml)	Tiempo de redisolución (min)	Cantidad en multímeros (%)	Turbidez (*NTU)	PDF (µG/ML)
C3	≤ 6	10	10	16	750 a 1250
C5	10	10	10	11	625 a 750

- 20 Los resultados anteriores demuestran que, a pesar de condiciones de calentamiento muy severas, la formulación según la invención (solución C5) permite proteger y solubilizar el fibrinógeno después de una liofilización y un tratamiento térmico de 90 °C, durante 72 horas, lo que queda revelado por los buenos valores de los parámetros estudiados. El liofilizado de fibrinógeno reconstituido también presenta una filtrabilidad, relativa a la superficie del filtro, de aproximadamente 2 ml/cm².
- 25

Ejemplo 5

- 30 Este ejemplo trata la influencia de la concentración de citrato trisódico contenido en una formulación de la invención (solución A) sobre la estabilización y la solubilización de una solución de fibrinógeno destinada a liofilizarse y calentarse a 80 °C, durante 72 horas. Un lote de fibrinógeno, obtenido a partir de un crioprecipitado, se disolvió a razón de 15g/l y se homogeneizó en la solución A en la que después se procedió a variar la concentración de citrato trisódico de una solución a la otra. Se obtuvieron cuatro soluciones: A1, A2, A3 y A4 respectivamente, con un contenido de 0,5 g/l, 1 g/l, 2 g/l y 11,2 g/l de citrato trisódico, respectivamente. A continuación, estas soluciones se filtraron, como se indica en el ejemplo 1, se extrajeron 5 ml de cada una de las soluciones y se colocaron en un frasco. Las cuatro soluciones anteriores que contenían el fibrinógeno sufrieron una liofilización y un tratamiento térmico indicado en el ejemplo 1. Los cuatro liofilizados de fibrinógeno no calentados por un lado, y calentados por el otro, se disolvieron en 5 ml de agua pura para inyección para obtener las cuatro soluciones anteriores A1, A2, A3 y A4. Se realizaron experimentos destinados a apreciar la influencia de la concentración de citrato trisódico de la formulación de la invención sobre la aptitud de la misma para proteger el fibrinógeno durante la liofilización y para solubilizarlo después de calentar las formas liofilizadas, respecto de las soluciones que no se sometieron a ninguna de las operaciones anteriores (soluciones testigo correspondientes). A tal efecto, para cada una de las soluciones A1, A2, A3 y A4 se midieron los siguientes parámetros: el tiempo de redisolución del liofilizado en el agua pura para inyección, la turbidez de la solución obtenida, las cantidades de multímeros insolubles, de fibrinógeno ponderal y coagulante, a través de métodos conocidos por el experto en la materia. Los diferentes resultados de las medidas se reflejan en el Cuadro 9 en el que las unidades de volumen corresponden a la solución del producto liofilizado reconstituido, por 5 ml de agua purificada para inyección.
- 35
- 40
- 45

Cuadro 9

	Antes de la liofilización				Después de la liofilización				Después del calentamiento (80°C, 72h)			
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4
Cantidad en multímeros (%)	8,3	6,6	7,3	7,5	6,9	5,6	5,8	4,2	6,3	6,2	5,9	5,2
Turbidez *NTU	11,0	11,0	10,9	10,1	11,3	11,1	10,9	10,1	11,6	11,3	11,2	10,3
Fibrinógeno coagulable (g/l)	17,3	17,2	17,3	16,3	14,9	14,3	14,6	14,2	14,9	14,9	15,2	15,2
Fibrinógeno ponderal (g/l)	16,6	16,1	16,0	15,8	16,2	16,1	16,0	15,2	16,7	15,7	16,9	16,1
Tiempo de redisolución (min)	-	-	-	-	5,50	10,87	6,37	10,03	10,35	9,83	11,55	9,95

(*NTU): Normalized Turbidity Units

Los resultados obtenidos demuestran que la elección de una concentración en el rango de valores de 0,5, con aproximadamente 12 g/l de citrato trisódico, contenido en una de las formulaciones de la invención anteriormente mencionadas, no solo permite una estabilización satisfactoria del fibrinógeno durante la liofilización y el tratamiento térmico, respecto de las soluciones testigo, sino que también permite conservar tiempos de redisolución globalmente idénticos del fibrinógeno liofilizado en comparación con el fibrinógeno calentado en seco.

Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra la influencia de la concentración de citrato trisódico contenido en una formulación según la invención (solución A) sobre la estabilización del factor XIII contenido en una solución de fibrinógeno destinada a liofilizarse, por un lado, y a calentarse a 80 °C, durante 72 horas, por otro lado. Estas dos proteínas, obtenidas a partir de un crioprecipitado, se disolvieron, a razón de 15 g/l (fibrinógeno + factor XIII) y se homogeneizaron en dos formulaciones según la invención (ejemplo 1) que contenían, respectivamente, 2,5 g/l (solución A) y 11,2 g/l (solución A4) de citrato trisódico. Antes de la liofilización, las soluciones A y A4 se sometieron a las operaciones descritas en el ejemplo 1. Los dos liofilizados de fibrinógeno y de factor XIII, por un lado no calentados y por el otro, calentados, se disolvieron en 5 ml de agua purificada para inyección para obtener las dos soluciones A y A4 anteriores. Se midió, respectivamente, la actividad en FXIII expresada UI/ml (de agua purificada para inyección) y el FXIII antígeno en UI/ml así como la relación de actividad en FXIII:FXIII-antígeno (marcado R) según métodos clásicos de análisis. Los diferentes resultados de las medidas se reflejan en el cuadro 10.

Cuadro 10

	Liofilizado no calentado			Liofilizado calentado		
	Actividad FXIII (UI/ml)	FXIII antígeno (UI/ml)	R	Actividad FXIII (UI/ml)	FXIII antígeno (UI/ml)	R
Sol. A	1,5	2,25	0,60	1,3	2,8	0,46
Sol. A4	9,9	8,22	1,2	8,6	8,15	1,06

Los resultados muestran una ligera baja de la relación R para cada uno de los liofilizados cuando estos han sido tratados térmicamente, respecto de los liofilizados no calentados. Por otra parte, se observa que la disminución de la relación R es menos importante cuando el contenido de citrato es más elevado. Este cuadro revela, además, que cuando se aumenta la concentración de citrato de una solución respecto de otra, en este caso, las soluciones A y A4, y se las liofiliza, también aumenta la relación R. Se observa el mismo fenómeno cuando los liofilizados están calentados. En consecuencia, la concentración de citrato influye sobre la estabilización del FXIII, lo que queda demostrado, fundamentalmente, por los valores de las diferentes actividades.

Ejemplo 7

En este ejemplo, se procede a la preparación de las cuatro soluciones, según el ejemplo 5, reconstituidas después de la liofilización y el tratamiento térmico (80 °C durante, 72 horas). El cuadro 11 presenta las medidas de la actividad en FXIII expresada UI/ml (de agua purificada para inyección) y de FXIII-antígeno en UI/ml así como la relación de actividad en FXIII:FXIII-antígeno (marcada R) en función de las variaciones de las concentraciones de citrato en las soluciones.

Cuadro 11

Solución	Actividad FXIII (UI/ml)	FXIII antígeno (UI/ml)	R
A1	4,8	6,35	0,76
A2	4,7	6,38	0,74
A3	5,5	6,49	0,85
A4	6,0	5,7	1,05

Los resultados obtenidos muestran que cuanto mayor es la concentración de citrato trisódico contenida en la formulación de la invención, menos degradaciones sufre el FXIII.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de obtención de proteínas crioprecipitables exentas de hidratos de carbono y de tampón tris, que comprende una etapa de inactivación viral mediante tratamiento térmico de un liofilizado de dichas proteínas, caracterizado porque comprende, antes de poner las proteínas en forma de liofilizado, una etapa inicial de adición, a dichas proteínas, de una formulación estabilizadora y solubilizadora exenta de hidratos de carbono y de tampón tris, que comprende una mezcla de arginina, con al menos un aminoácido hidrófobo y citrato trisódico.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la formulación está constituida por dicha mezcla de arginina, con al menos un aminoácido hidrófobo y citrato trisódico.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la concentración de arginina está comprendida entre 25 y 50 g/l.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque la concentración de arginina está comprendida entre 35 y 45 g/l.
- 20 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la concentración de citrato trisódico está comprendida entre 0,5 y aproximadamente 12 g/l.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el aminoácido hidrófobo es leucina, isoleucina o una mezcla de las dos.
- 25 7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque la concentración de leucina, isoleucina o su mezcla está comprendida entre 5 y 15 g/l.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 6 y 7, caracterizado porque la concentración de leucina o isoleucina o su mezcla está comprendida entre 9 y 11 g/l.
- 30 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 caracterizado porque, además, se agregó leucina y/o lisina a la formulación.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque la concentración de la glicina y la lisina está comprendida entre 1 y 5 g/l.
- 35 11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque la concentración de la glicina y la lisina está comprendida entre 1,5 y 2,5 g/l.
- 40 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque la liofilización se realiza a temperaturas comprendidas entre -40 y -30 °C, durante 48 horas.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque el tratamiento térmico de inactivación viral se realiza a temperaturas comprendidas entre 80 y 90 °C, durante 72 horas.
- 45 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque además comprende, antes de la etapa de adición de la formulación estabilizadora y solubilizadora a una composición líquida de proteínas crioprecipitables, al menos una etapa suplementaria de inactivación y/o de eliminación de los virus de dicha composición líquida mediante disolvente-detergente y/o nanofiltración en filtros de 35 nm.
- 50 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque es aplicable a todas las proteínas crioprecipitables.
16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque es aplicable a al menos una proteína elegida entre el factor VIII, el factor von Willebrand, el factor XIII, el fibrinógeno y la fibronectina.
- 55 17. Concentrado de al menos una proteína crioprecipitable exenta de hidratos de carbono y de tampón tris, que puede obtenerse mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
18. Concentrado según la reivindicación 17, destinado a un uso terapéutico.
- 60 19. Concentrado según la reivindicación 17 ó 18, que consiste en un liofilizado de fibrinógeno disuelto obtenido mediante el procedimiento de la reivindicación 13, para presentar una drenabilidad de aproximadamente 2 ml/cm² en un filtro con una porosidad de 0,20 ± 0,02 µm.
- 65 20. Formulación estabilizadora y solubilizadora, exenta de hidratos de carbono y de tampón tris, para las proteínas crioprecipitables destinadas a someterse a una liofilización y a un tratamiento térmico de inactivación viral,

caracterizado porque comprende una mezcla de arginina, presente en una concentración comprendida entre 35 y 45 g/l, al menos un aminoácido hidrófobo y citrato trisódico, presente en una concentración comprendida entre 0,5 y 12 g/l.

5 21. Formulación estabilizadora y solubilizadora según la reivindicación 20, caracterizado porque la formulación está constituida por dicha mezcla de arginina, con al menos un aminoácido hidrófobo y citrato trisódico.