

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 014**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2008 E 08750714 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 2152867**

54 Título: **Métodos para preparar factor X, factor X activado, factor X inactivado y factor Xa inactivado**

30 Prioridad:

30.05.2007 GB 0710321

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.04.2013

73 Titular/es:

**BIO PRODUCTS LABORATORY LIMITED (100.0%)
Dagger Lane Elstree
Hertfordshire WD6 3BX, GB**

72 Inventor/es:

**LLOYD, JOANNE y
FELDMAN, PETER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 400 014 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para preparar factor X, factor X activado, factor X inactivado y factor Xa inactivado

La presente invención se refiere a métodos para preparar factor X humano, factor X humano activado (factor Xa), factor X humano inactivado y factor Xa humano inactivado.

5 El factor X es un factor de coagulación normalmente presente en sangre humana. La deficiencia del Factor X es un raro trastorno hemorrágico que afecta a 1 en 500.000 y 1 en 1.000.000 de la población. Está caracterizado por una tendencia a la hemorragia excesiva, similar al causado por las deficiencias del factor VIII y factor IX en la hemofilia A y B respectivamente. No hay actualmente tratamientos autorizados específicamente para la deficiencia del factor X en ninguna parte del mundo. En particular, no hay concentrados clínicos de factor X actualmente disponibles para su
10 uso en el tratamiento de la deficiencia de factor X. En su lugar, los médicos tienen que confiar en infusiones de plasma o de concentrados de complejo de protrombina (PCC). Sin embargo, hay varias desventajas que acompañan al uso de plasma o PCC para el tratamiento de la deficiencia de factor X.

15 El plasma contiene solo una baja concentración de factor X (aproximadamente 1 unidad por ml), de modo que se necesita un gran volumen de infusión para conseguir incluso un pequeño incremento en el nivel de factor X circulante de un paciente. El tratamiento está condicionado por la necesidad de parar la infusión antes de que se haya suministrado una dosis terapéutica total, para evitar la sobrecarga de volumen que provoca desequilibrio osmótico y daño pulmonar agudo relacionado con la transfusión. El plasma también requiere almacenamiento refrigerado o congelado que puede restringir la disponibilidad para el paciente.

20 Los concentrados de complejo de protrombina (PCC) contienen algo de factor X, pero este es solo un componente muy minoritario de la proteína total presente. Los PCCs no están ensayados o etiquetados para esta indicación lo que conduce a una dosis muy variable. Muchos de estos productos más viejos están preparados de plasma mezclado sin el margen de seguridad añadido de múltiples etapas de inactivación de virus durante la fabricación. La mayor parte requieren almacenamiento refrigerado que, como con el plasma, puede restringir la disponibilidad para el paciente. Como el principal constituyente del PCC es protrombina, y los PCCs tienen el riesgo de ser parcialmente
25 activados por el procedimiento de fabricación, hay un riesgo de que el uso de PCC dé como resultado un efecto secundario trombótico durante el tratamiento, que podría ser fatal. Aunque el PCC contiene más factor X humano que el plasma en el volumen disponible, es deseable que contenga la dosis terapéutica en un volumen tan pequeño como sea posible, particularmente cuando muchos de los pacientes tratados son niños pequeños.

30 El documento WO 89/05650 describe un método para por lo menos separar parcialmente factores de coagulación sanguínea dependientes de vitamina K, incluyendo el Factor X, de una mezcla que contiene por lo menos uno de tales factores, por ejemplo, un concentrado de complejo de protrombina. El método comprende la adsorción de la mezcla sobre una columna de cromatografía de quelato metálico. Sin embargo, el factor X producido según el método del documento WO 89/05650 aún contiene significativas cantidades de protrombina, hasta 40-50% en peso. La presencia de protrombina en un concentrado de factor X es indeseable porque la protrombina tiene una semivida
35 media en circulación mayor que el factor X. Si un paciente es infundido con tratamiento que contiene ambas proteínas, esto puede provocar un desproporcionado y acumulativo incremento de protrombina en plasma que puede desequilibrar entonces el equilibrio hemostático en favor de la generación de trombina y la formación de coágulo (hemostasis/trombosis). Sería deseable la retirada o reducción de protrombina en un concentrado de factor X para minimizar el riesgo de generación espontánea de trombina durante la fabricación o almacenamiento del producto, que podría provocar también reacciones tromboticas durante el uso clínico.
40

El documento EP 0617049 describe un procedimiento para la purificación del factor IX, factor X y factor II de sus fracciones de plasma humano que comprende separaciones cromatográficas de intercambio aniónico seguidas de cromatografía en resina de adsorción selectiva.

45 FELDMAN. P. A. ET AL.: "Preparation of a high purity factor X concentrate using metal chelate affinity chromatography" *Biotechnology of blood proteins*, XX, XX, Vol. 227, 1 January, 1993, páginas 63-68, describe la purificación de factor IX de plasma empobrecido crioprecipitado usando cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sefarosa y cromatografía de afinidad de ion metálico.

El documento WO 94/01466 describe un procedimiento para activar factor II a factor IIa incubando factor II en presencia de factor V, factor Xa, fosfolípidos e iones calcio.

50 El documento WO 2004/050904 describe un procedimiento para la preparación de disolución purificada de protrombina y factor X de una fracción de plasma sanguíneo que comprende cromatografía de gel de quelato metálico y cromatografía de gel de afinidad.

El documento WO 2006/067230 describe la preparación de composiciones de proteína dependiente de vitamina K con bajo contenido de contaminantes proteínicos.

55 El documento WO 96/13274 describe un procedimiento para producir una preparación muy purificada de una forma inhibida de un factor sanguíneo activado.

El documento WO 01/51067 describe una composición anticoagulante que comprende por lo menos dos factores sanguíneos inactivados y métodos para su preparación.

El documento WO 90/15619 describe una composición anticoagulante que contiene factor Xa que tiene el sitio de serina activa inactivado.

5 KAISER. B. ET AL.: "Inactivation of factor Xa by the synthetic inhibitor DX-9065a causes strong anticoagulant and antiplatelet actions in human blood". BLOOD COAGULATION AND FIBRINOLYSIS, Vol. 10, no. 8, December 1999, páginas 495-501, describe los efectos anticoagulantes y antiplaquetas del inhibidor directo del factor Xa DX-9065a en plasma humano usando ensayos de coagulación global.

10 AHMAD. S ET AL.: "Rapid purification of factor IX, factor X y prothrombin by immunoaffinity and ion Exchange chromatography", THROMBOSIS RESEARCH, TARRYTOWN, NY, US, Vol. 55, no.1, 1 July 1989, páginas 121-133, describe la purificación de factor IX humano de plasma.

MILETICH J. P ET AL.: "The synthesis of sulfated dextran beads for isolation of human plasma coagulation factors II, IX and X", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS INC, NEW YORK, Vol. 105, no. 1, 1 June 1980, páginas 304-310, describe una nueva matriz para la cromatografía de factores de coagulación.

15 ESNOUF. M. P. ET AL.: "A method for the simultaneous isolation of factor X and prothrombin from bovine plasma", BIOCHEMICAL JOURNAL, Vol. 131, no. 4, 1973, páginas 781-789, describe el aislamiento por cromatografía sobre DEAE-Sefadex y purificada adicionalmente por cromatografía en DEAE-Sefadex 2.

20 BAJAJ S. P. ET AL.: "Simultaneous purification of bovine prothrombin and factor X. Activation of prothrombin by trypsin-activated factor X", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 248, no. 22, 25 november 1973, páginas 7729-7741, describe el aislamiento por cromatografía en DEAE-celulosa y purificación adicional del factor X bovino por cromatografía en DEAE-Sefadex.

Por lo tanto es necesario aún un procedimiento para la preparación de factor X que sea eficiente, se pueda llevar a cabo a escala industrial, que permita la incorporación de múltiples etapas de reducción de virus y que proporcione un producto farmacéuticamente útil.

25 En un aspecto, la invención por lo tanto proporciona un método para la separación de factor X humano de un material de partida que comprende factor X humano y protrombina, comprendiendo el método el uso de cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado (IMAC, denominada también cromatografía de quelato metálico). El método comprende:

a) adsorber el material de partida sobre un substrato de cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado;

30 b) eluir las proteínas adsorbidas seleccionadas del substrato por reducción de la fuerza iónica y/o cambio de pH del tampón de elución;

c) monitorizar el eluato para ver el comienzo de la elución de protrombina y factor X, desechando una primera porción del eluato y recogiendo una segunda porción subsecuente del eluato enriquecida en factor X; y

d) retirar la protrombina residual en el factor X obtenido en la etapa c) por cromatografía de intercambio aniónico.

35 La cromatografía de intercambio aniónico puede proporcionar separación adicional de factor X de protrombina. Además, proporciona un método delicado para concentrar el factor X hasta una potencia farmacéuticamente útil para formulación.

40 En el método descrito en el documento WO 89/05650, la protrombina y el factor X se co-eluyen del substrato, conduciendo a fracciones de factor X que contienen altas cantidades de protrombina. Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que la protrombina se eluye preferencialmente en el frente del pico de elución de proteína, mientras que el factor X se eluye en una concentración sustancialmente constante en toda la elución de proteína. Es por lo tanto posible excluir el pico principal de elución de proteína, y recoger el factor X solo en la parte de la cola del pico sin pérdida significativa de rendimiento y con considerable incremento de pureza comparado con el método descrito en el documento WO 89/05650.

45 El material de partida para el método de la invención puede ser cualquier disolución que comprende por lo menos protrombina y factor X humano. Preferentemente, el material de partida será plasma o fracción derivada de plasma tal como plasma empobrecido crioprecipitado y/o plasma empobrecido en Fracción I, más preferentemente un extracto de una fracción de plasma. Lo más preferentemente, el material de partida es una mezcla de protrombina (factor II), factor IX y factor X, por ejemplo, complejo de protrombina. Pueden también estar presentes otras
50 proteínas que incluyen factor VII, proteína C, proteína S, proteína Z e inhibidor de la inter-alfa-tripsina. Alternativamente, el material de partida podría ser una disolución recogida de un tejido transgénico o incluso de medio de cultivo recombinante del que se cosecha también una contaminante y co-fraccionante proteína tal como protrombina.

El material de partida se puede preparar por cualquier método apropiado conocido en la técnica. Por ejemplo, los métodos para la separación de complejo de protrombina de plasma y fracciones de plasma son bien conocidos en la industria de fraccionamiento de plasma. El complejo de protrombina se aísla más comúnmente de plasma y fracciones de plasma (por ejemplo, plasma empobrecido crioprecipitado, plasma empobrecido precipitado de fracción I o una mezcla de crioprecipitado y plasma empobrecido precipitado de fracción I) por cromatografía de intercambio aniónico. Una fuente alternativa de material de partida enriquecido en complejo de protrombina es el precipitado generado por fraccionamiento etanólico de plasma. En este procedimiento, diferentes proteínas de plasma se reparten en diferentes fracciones de precipitado por ajuste de la concentración de etanol, temperatura y pH. Un material de partida particularmente preferido es complejo de protrombina obtenido de plasma humano empobrecido crioprecipitado por cromatografía de intercambio aniónico usando un medio de intercambio aniónico tal como DEAE-Sefarosa (Feldman PA, Bradbury PI, Williams JD, Sims GE, McPhee JW, Pinnell Ma, Harris L, Crombie GI, Evans DR, Large-scale preparation and biochemical characterization of a new high purity factor IX concentrate prepared by metal chelate affinity chromatography, Blood Coagulation and Fibrinolysis 5:939-948 (1994)). Esta etapa de cromatografía de intercambio aniónico se puede realizar cromatográficamente en modo columna, en modo discontinuo, o en un modo superficial en el que el intercambiador aniónico está unido a un soporte inerte de filtro o membrana.

En la etapa a) del método de la invención, el material de partida se carga sobre un sustrato de IMAC. Preferentemente, el sustrato está presente en una columna para facilidad de procesamiento. Se puede usar cualquier ion metálico apropiado, incluyendo iones metálicos divalentes tales como cobre, cinc o níquel, preferentemente cobre. Los sustratos de cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado apropiados para uso en el procedimiento de la invención incluyen los descritos en el documento WO89/05650, gel de metacrilato con ligandos multisustituidos sobre los separadores de cadena lateral (por ejemplo, Fractogel EMD Chelate de Merck), gel de metacrilato con grupos quelantes individuales sobre el brazo separador (por ejemplo, Toyopearl Chelate de Tosoh Bioscience), polímero estable a la presión con un grupo funcional quelante de ácido iminodiacético (por ejemplo, Profinity IMAC de Bio-Rad Laboratories) y gel de agarosa reticulado (por ejemplo, Sefarosa quelante FF de GE Healthcare). Un sustrato preferido es Sefarosa quelante FF cargada con iones cobre.

Las etapas a) y b) del método de la invención se pueden realizar cromatográficamente en modo columna o en modo discontinuo en volumen. Alternativamente, estas etapas se pueden realizar también en un modo de superficie en el que el complejo quelante está unido a un soporte inerte de filtro o membrana. Sin embargo se prefiere la cromatografía en columna por su facilidad de funcionamiento a escala industrial.

Las condiciones de carga, incluyendo el tampón usado, se deben escoger de tal modo que el factor X (y protrombina co-ligada) en el material de partida estén unidos al sustrato. La concentración de sal del material de partida se puede ajustar para minimizar la adsorción de proteína no específica. Los contaminantes no deseados que no se unen o se unen solo débilmente al sustrato se pueden retirar a continuación por lavado. Por ejemplo, si el material de partida se ha sometido previamente a una etapa de inactivación de virus con detergente/disolvente, la mayor parte de los reactivos disolventes o detergentes restantes no se unen al sustrato y se retiran fácilmente por lavado. Cualquier proteína que está solo débilmente unida al sustrato se puede retirar también durante la etapa de lavado. Alternativamente, si los contaminantes no deseados se unen al sustrato se pueden retirar por elución selectiva antes de que se eluya el factor X, o pueden permanecer unidos al sustrato mientras se eluye selectivamente el factor X.

La carga y lavado se puede realizar a relativamente alta fuerza iónica (por ejemplo, cloruro de sodio 500 mM y sales tampón 100 mM) para minimizar la unión no específica de proteína al medio de IMAC y proporcionar retirada efectiva de los compuestos químicos más indeseados que pueden estar presentes en el material de partida. La inclusión de citrato en el tampón puede retirar algunos de los iones metálicos débilmente unidos que pueden si no contaminar las proteínas eluidas subsecuentemente.

El eluato se debe monitorizar para ver el contenido de proteína, por ejemplo, monitorizando para ver la absorbancia a 280 nm. La absorbancia a 280 nm es una medida de la elución de proteína no específica. Alternativamente, el eluato se podría muestrear y ensayar para ver la protrombina y el factor X usando métodos conocidos en la técnica. El lavado inicial debe continuar hasta que no se eluya más proteína débilmente unida. La protrombina y el factor X se pueden eluir a continuación usando cualquier tampón de elución apropiado. La elución del factor X se consigue por reducción de la fuerza iónica y/o cambio de pH (por ejemplo, de 6,5 a 7,0) del tampón. La reducción de la fuerza iónica (por ejemplo, de NaCl 500 mM a NaCl 100 mM) y un incremento en el pH del tampón (por ejemplo, de 6,5 a 7,0) son preferidos para diferenciar entre el factor X y otras proteínas unidas.

Una vez que se detecta la elución de proteína, la primera porción del eluato recogido se puede desechar, ya que contendrá altos niveles de protrombina. Una vez que se ha eluido la mayoría de la protrombina, se debe recoger una segunda porción de eluato enriquecido en factor X (comparado con el material de partida). Una vez que se conoce el comportamiento de elución de un particular sustrato de IMAC/material de partida/tampón de elución, puede ser posible identificar la primera y segunda porciones del eluato simplemente en base al volumen de eluato. Por ejemplo, si el sustrato de IMAC se carga en una columna, la primera y segunda porción del eluato pueden estar definidas por el volumen del lecho de gel. En una realización no limitante, la primera porción de eluato puede comprender aproximadamente el primer 25% del volumen total de eluato y la segunda porción enriquecida en factor

X puede comprender aproximadamente el 75% del volumen total de eluato subsecuente. Alternativamente, los contenidos de protrombina y factor X de diferentes fracciones de eluato se pueden medir usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la primera porción se podría recoger hasta que la relación de actividad de protrombina:actividad de factor X sea menor de alrededor de 0,01 unidad/unidad y la segunda porción enriquecida en factor X después de que la relación actividad de protrombina:actividad de factor X haya caído por debajo de alrededor de 0,01 unidad/unidad.

La segunda porción de eluato enriquecida en factor X se purifica adicionalmente por cromatografía de intercambio aniónico. Se ha encontrado sorprendentemente que la cromatografía de intercambio aniónico puede ser efectiva para retirar la protrombina residual del factor X, lo que conduce a un incremento en pureza del factor X. Se ha encontrado que la protrombina se une ligeramente más fuertemente que el factor X al medio de cromatografía de intercambio aniónico, con el resultado de que se eluye ligeramente más tarde que el factor X. A la fuerza iónica escogida para la elución, el pico de elución de protrombina tiende también a ser más ancho que el pico de elución del factor X. El efecto global es que la elución de protrombina se puede retrasar con respecto al factor X y los dos se pueden separar entonces por recogida selectiva del eluato. La etapa de cromatografía de intercambio aniónico es también ventajosa para retirar cualquier metal residual del sustrato de quelato metálico que puede estar presente en el eluato, y/o cualquier reactivo detergente/disolvente residual que pueda estar presente. La selección cuidadosa de la química del tampón durante la etapa de intercambio aniónico permite la separación del factor X de protrombina o factor IX (si está presente) contaminantes. La carga, tampones de lavado y elución para la etapa de cromatografía de intercambio aniónico se deben escoger de tal modo que se maximice la unión del factor X al medio, y se maximice también la separación del factor X de la protrombina contaminante.

Se puede usar cualquier medio de cromatografía de intercambio aniónico. Un medio particularmente apropiado es gel de intercambio aniónico de Sefarosa DEAE, por ejemplo, DEAE Sefarosa de flujo rápido (fast flow "FF").

Preferentemente, el intercambiador aniónico se equilibra con tampones que contienen solo citrato a alrededor de pH 6.0 antes de cargar para maximizar la unión de factor X. Las condiciones de carga, incluyendo el tampón usado, se deben escoger de modo que el factor X se une al medio. Si es necesario, la segunda porción del eluato recogido en la etapa c) se diluye para reducir la fuerza iónica antes de cargar sobre el medio de cromatografía de intercambio aniónico. Una conductividad apropiada es 10-18 mS/cm. Hay una máxima concentración de sal/fuerza iónica más allá de la cual el factor X no se unirá al medio de cromatografía de intercambio aniónico. Preferentemente, la concentración de sal se ajusta para proporcionar máxima unión en el mínimo volumen, para evitar excesivos carga de columna/tiempos de adsorción, que pueden comprometer la integridad de la proteína o la seguridad microbiológica.

Después de cargar, lavar con un tampón apropiado retira cualquier impureza sin unir, por ejemplo, cualquier disolvente, detergente o metal residual que se pueda arrastrar de etapas previas del procedimiento. Un tampón de lavado preferido contiene sales tanto citrato como fosfato y concentración elevada de cloruro de sodio para retirar cualquier reactivo químico residual usado durante las etapas previas de purificación. El uso de tal tampón de lavado retira también los aniones citrato y fosfato que se unen débilmente al medio de intercambio aniónico durante el equilibrado y carga de la muestra a baja fuerza iónica, pero no eluye factor X. Se encontró que la retirada de iones citrato y fosfato unidos al gel en esta etapa previno su desprendimiento del intercambiador aniónico durante la subsecuente etapa de fuerza iónica que eluyó la proteína unida. Si no se trata con el tampón de lavado, se encontró que los iones citrato y fosfato unidos serían retirados en el frente salino incrementado producido por la subsecuente etapa de tampón de elución, dando como resultado la interrupción del límite de la sal (fuerza iónica incrementada) y la distorsión de la estrecha elución de proteína. Esto podría comprometer potencialmente tanto la potencia del factor X como su separación de otras proteínas.

El factor X purificado se eluye a continuación usando un tampón de elución apropiado. Preferentemente, los constituyentes del tampón de elución se seleccionan para eluir factor X a una concentración que permite el procesado subsiguiente sin la necesidad de una etapa separada de concentración o diafiltración. Un tampón de elución preferido contiene aproximadamente citrato 10 mM, fosfato 10 mM y cloruro de sodio 310 mM a pH 7,0. Se encontró que esta combinación de sal y ajuste de pH eluía factor X en un pico estrecho, proporcionando producto concentrado que no necesitaba concentración adicional antes de la formulación en forma de un producto farmacéutico.

Después de la elución del sustrato de IMAC, o del medio de intercambio aniónico si se usa, el factor X purificado se puede formular para su uso farmacéutico. Preferentemente, esto implicará la liofilización del factor X, opcionalmente en presencia de un estabilizante apropiado, para dar un concentrado de factor X que es apropiado para la reconstitución para uso farmacéutico. Se prefiere un concentrado de factor X liofilizado a una disolución de factor X ya que será estable para el almacenamiento a más altas temperaturas y durante periodos más largos de lo que lo sería una disolución. También proporciona un producto estable que se puede exponer con seguridad a una etapa final de inactivación de virus por tratamiento térmico.

Una ventaja del procedimiento de la invención es que permite la fácil incorporación de una o más etapas de inactivación o reducción de virus. Los métodos de inactivación o reducción de virus apropiados son conocidos en la técnica e incluyen pasteurización, tratamiento con detergente/disolvente, tratamiento térmico en seco y filtración de

virus. Preferentemente por lo menos dos etapas de inactivación o reducción de virus se incluyen en el método, más preferentemente por lo menos tres.

5 Por ejemplo, el material de partida se puede someter a una etapa de inactivación de virus antes de cargarlo sobre el sustrato de cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado. La inactivación de virus por detergente/disolvente se puede llevar a cabo usando reactivos y métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, los documentos US 4.481.189, US 4.613.501 y US 4.540.573, todos los cuales se incorporan aquí como referencia). Los disolventes apropiados incluyen fosfato de tri-n-butilo (TnBP) y éter, preferentemente TnBP. Los detergentes apropiados incluyen polisorbato (Tween) 80, polisorbato (Tween) 20, colato de sodio y Triton X-100.

10 Un detergente preferido es polisorbato 80 y una combinación particularmente preferida de detergente/disolvente es polisorbato 80 y TnBP.

15 Una etapa de reducción de virus se puede llevar a cabo en el eluato de la etapa de cromatografía de quelato metálico o una etapa subsecuente de cromatografía de intercambio aniónico. La filtración a través de un filtro capaz de retirar virus se prefiere para la segunda etapa de reducción de virus. Esta incluye filtros de retención de virus comercialmente disponibles, por ejemplo, el filtro de retención de virus Planova 15N (disponible de Asahi Kasei Medical, Japan), el filtro Ultipor DV20 (disponible de Pall Corporation), el filtro Virosart CPV (disponible de Sartorius) y los filtros Viresolve (disponibles de Millipore). Un filtro preferido es el filtro Planova 15N ya que proporciona buen flujo de proteína y retirada de virus. Tales filtros tienen también el potencial de reducir o retirar priones u otros agentes causantes de encefalopatía espongiiforme transmisible.

20 Se puede llevar a cabo también una etapa de inactivación de virus en el factor X después de que ha sido formulado. Por ejemplo, una formulación liofilizada se puede someter a una etapa final de inactivación de virus por tratamiento térmico en seco. Tal etapa puede implicar calentar la formulación liofilizada hasta alrededor de 80°C durante alrededor de 72 horas. Se sabe que estas condiciones inactivan los virus encapsulados y no encapsulados.

25 En una realización preferida, el método de la invención comprende tres etapas de reducción o inactivación de virus: tratamiento con detergente/disolvente del material de partida; filtración de virus del eluato de la etapa de cromatografía de quelato metálico o una etapa subsecuente de cromatografía de intercambio aniónico; y tratamiento térmico en seco del producto final formulado.

En la realización más preferida, el método de la invención comprende:

- 30 i) tratamiento con detergente/disolvente del material de partida que comprende factor X humano y protrombina;
- ii) adsorber el material de partida tratado con detergente/disolvente sobre un sustrato de cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado;
- iii) eluir proteínas adsorbidas del sustrato;
- iv) monitorizar el eluato para ver el comienzo de la elución de protrombina/factor X, desechando una primera porción del eluato y recogiendo una subsecuente segunda porción del eluato enriquecida en factor X;
- 35 v) retirar la protrombina residual en la segunda porción del eluato llevando a cabo cromatografía de intercambio aniónico;
- vi) filtrar el producto de la etapa v) a través de un filtro de retención de virus;
- vii) liofilizar el producto filtrado de la etapa vi), opcionalmente en presencia de uno o más estabilizantes; y
- viii) someter el producto liofilizado a una etapa de tratamiento térmico para inactivación/reducción de virus.

La Figura 2 ilustra la realización más preferida del método de la invención.

40 Los métodos de la invención en una realización proporcionan factor X funcional que no ha sido accidentalmente activado (es decir, factor X "nativo"). La activación es indeseable para el tratamiento de la deficiencia de factor X porque el factor X activado puede causar efectos secundarios trombogénicos indeseados. Sin embargo, en otra realización, los métodos de la invención se pueden usar también para preparar factor X activado (factor Xa) incorporando una etapa de activación en el método. El factor X se puede activar en cualquier etapa antes de la formulación del producto final. La activación del factor X a factor Xa se puede llevar a cabo en cualquier etapa durante los métodos de la invención, incluyendo:

- 45 en el material de partida, por ejemplo, el plasma fuente, una fracción de plasma, o complejo de protrombina;
- en el eluato enriquecido en factor X de la etapa de cromatografía de afinidad de ion metálico;
- en el factor X diluido antes de la carga sobre un intercambiador aniónico para purificación adicional;
- 50 en el factor X eluido de un intercambiador; y
- en el factor X filtrado para virus.

Preferentemente, la activación se lleva a cabo en alguna etapa después de la etapa de cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado, porque antes puede activar cualquier otro factor de coagulación presente en el material de partida y comprometer su idoneidad para su fabricación en forma de otros productos terapéuticos. Idealmente, la etapa de activación se lleva a cabo tan tarde como sea posible en el procedimiento de fabricación, ya que una vez activado, el factor X puede ser más lábil (es decir, menos estable). También idealmente, la etapa de activación se lleva a cabo en una etapa en el método que permite que el factor X activado sea almacenado pendiente de análisis antes de la formulación, llenado y liofilización final. Lo más preferentemente, la activación tiene lugar entre la etapa de intercambio aniónico y la formulación del factor X filtrado para virus.

La activación de factor X a factor Xa se puede llevar a cabo usando cualquier método apropiado. Por ejemplo, el factor X se puede activar por calcio solo, o en combinación con un veneno tal como el veneno de víbora de Russell. Otros iones metálicos, particularmente iones metálicos divalentes tales como magnesio pueden potenciar también la activación del factor X. Para minimizar cualquier riesgo de que queden compuestos químicos de activación en el producto final, el activador se puede inmovilizar sobre una matriz sólida y pasar una disolución de factor X a través de la matriz. La activación ocurre durante el paso y el factor X fluye sin dilución. Por ejemplo, se pueden inmovilizar iones metálicos sobre una matriz quelante. Alternativamente, la activación con iones metálicos se puede hacer en disolución y la disolución se puede pasar a través de una matriz quelante para retirar los iones metálicos después. Los venenos tales como un veneno de víbora de Russell se pueden inmovilizar sobre matrices activadas por ligando tales como Sefarosa activada con CNBr o Sefarosa activada con epoxi.

En etapas anteriores en el procedimiento de purificación de factor X, puede ser posible usar el mecanismo de retroalimentación por el que la protrombina se convierte en trombina por pequeñas cantidades de factor X activado y la trombina a continuación acelera la activación de más factor X. El factor X se puede activar alternativamente por un descenso de temperatura en presencia del factor VII utilizando de este modo la "activación fría" del factor VII, activando entonces el factor VII al factor X.

El factor X y el factor Xa preparados según la invención se pueden formular en forma de una composición farmacéutica con uno o más diluyentes, excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables. El factor X o factor Xa es preferentemente por lo menos 30% en peso, más preferentemente por lo menos 70% en peso de la proteína total presente en cualquier composición farmacéutica, y lo más preferentemente es la única proteína presente. La composición puede ser una disolución congelada, estar en forma líquida o liofilizada, pero está preferentemente liofilizada para maximizar la vida útil. Las composiciones liofilizadas son también preferibles ya que se pueden someter a una etapa de tratamiento térmico en seco para la inactivación de virus.

Los estabilizantes apropiados son compuestos que ayudan a estabilizar el factor X o factor Xa durante las etapas de liofilización y/o tratamiento térmico (es decir, ayudan a mantener la actividad del factor X o factor Xa en estas etapas). Dependiendo de la indicación clínica para uso de la composición, tales estabilizantes incluyen, pero no están limitados a, carbohidratos tales como sacarosa, trehalosa y dextrano; aminoácidos tales como glicina; polivinilpirrolidona; y polietilenglicoles. Un estabilizante preferido es sacarosa.

Para una disolución de factor X o factor Xa para infusión, sería aceptable un pH entre alrededor de 6,0 y alrededor de 8,0 y una concentración de sal entre alrededor de 150 mM y alrededor de 400 mM de cloruro de sodio. Los tampones apropiados incluyen aquellos con concentraciones de citrato y fosfato entre 5mM y 50 mM, y concentraciones de cloruro de sodio entre 50 mM y 400 mM. Una composición liofilizada preferida comprende, en la reconstitución, 1-2% peso/peso de sacarosa y cloruro de sodio 150-300 mM a un pH de 6,5-7,3. Una formulación más preferida comprende 1% peso/peso de sacarosa, citrato 10 mM, fosfato 10 mM y cloruro de sodio 200-300 mM a un pH de 7,3.

La cantidad de factor X en el producto final debe ser tal que, en la reconstitución, pueda proporcionar una disolución que contiene entre alrededor de 20 y alrededor de 200 unidades internacionales de factor X por ml (o una cantidad equivalente de factor Xa cuando se requiera para aplicaciones clínicas particulares). La concentración deseada estará gobernada principalmente por consideraciones clínicas, farmacéuticas y comerciales.

Las composiciones liofilizadas se pueden preparar añadiendo un estabilizante y cualquier ingrediente de formulación adicional a una disolución de factor X o factor Xa. La disolución se puede opcionalmente filtrar estérilmente, por ejemplo, a través de un filtro de tamaño de poro de 0,2 μm , antes de ser introducida en recipientes apropiados, por ejemplo, viales de vidrio. Los recipientes se liofilizan a continuación. Las condiciones de liofilización apropiadas son congelación a alrededor de -50°C , secado primario durante alrededor de 72 a 98 horas a temperatura de almacenamiento de alrededor de -20 a -34°C , preferentemente alrededor de -25°C , y una presión en la cámara de alrededor de 17 a 200 μbar (1,7 a 20 Pa), preferentemente alrededor de 100 μbar , y secado secundario durante alrededor de 18 horas a una temperatura de almacenamiento de alrededor de $+28$ a $+32^{\circ}\text{C}$, preferentemente $+30^{\circ}\text{C}$ y una presión en la cámara de alrededor de 0 a 60 μbar (0 a 6 Pa), preferentemente alrededor de 30 μbar (3 Pa). Al final de la liofilización secundaria los recipientes se cierran a vacío y se sellan.

Los ingredientes de la composición se seleccionan preferentemente tal que la composición es estable durante periodos prolongados de almacenamiento, preferentemente 2-3 años, se puede almacenar a temperatura ambiente, y se puede reconstituir para dar una disolución apropiada de factor X o factor Xa para uso clínico. La reconstitución

de una composición liofilizada se puede llevar a cabo introduciendo agua estéril para inyección dentro del vial por un método aséptico. En la práctica, esto implica la transferencia de agua estéril dentro del vial usando una aguja o jeringuilla o un dispositivo comercial para transferir disolventes farmacéuticos. El procedimiento de liofilización deja el producto en el vial a vacío parcial, de modo que se introduce agua en el vial por el vacío, que puede ayudar al procedimiento de reconstitución. Cuanto más rápida la reconstitución mejor, ya que el producto podría ser necesitado por un paciente que experimenta una hemorragia crítica. Es aceptable un tiempo de reconstitución de alrededor de 1-10 minutos, pero preferentemente el tiempo de reconstitución es menor de alrededor de 60 segundos, y más preferentemente menor de alrededor de 30 segundos.

El concentrado de factor X o factor Xa liofilizado se puede someter a una etapa de reducción de virus por tratamiento térmico en seco. Las condiciones apropiadas incluyen calentamiento entre 60°C y 100°C durante entre 1 y 144 horas. Generalmente, más bajas temperaturas y/o más cortos tiempos de tratamiento darán como resultado más altos rendimientos de proteína funcional pero menos eficiente inactivación de virus. Las condiciones preferidas son tratamiento térmico a alrededor de 80°C durante alrededor de 72 horas ya que se ha encontrado que esto proporciona tanto buena inactivación de virus como aceptable rendimiento de factor X.

El factor X o factor Xa preparado según el método de la invención se puede usar para el tratamiento de la deficiencia del factor X, y cualquier otro estado para el que se ha propuesto el tratamiento con factor X. En particular, el método de la invención permite la preparación de factor X o factor Xa altamente purificado con múltiples etapas de inactivación de virus y que se puede presentar al paciente en una formulación concentrada de pequeño volumen. Las formulaciones obtenidas del método de la invención proporcionan también un producto liofilizado estable que se puede almacenar durante periodos extensos a temperatura ambiente o a elevadas temperaturas.

El factor X preparado según el método de la invención se puede usar también para el tratamiento de pacientes que han desarrollado inhibidores de las proteínas de coagulación de la sangre. Algunos pacientes (alrededor de 5-10%) con deficiencia de factor X o factor Xa (hemofilia A o B) desarrollan inhibidores o autoanticuerpos en respuesta a terapia de sustitución con concentrados de factor VIII o factor IX. Estos pacientes son extremadamente difíciles de tratar durante los episodios de hemorragia aguda que pueden ser muy graves. El concentrado de factor X y/o concentrado de factor X activado (factor Xa) se podría usar para tratar estos pacientes deteniendo los episodios de hemorragia aguda.

El factor X actúa directamente en la penúltima etapa del procedimiento de reacción de coagulación de la sangre. El factor X se activa y a continuación cataliza la activación de protrombina a trombina que a su vez escinde fibrinógeno y factor XIII para formar el coágulo de fibrina reticulada. El factor VIII es un cofactor en la activación del factor X que es catalizado por el factor IX activado. De este modo la deficiencia del factor VIII o factor IX se podría eludir por la terapia de suplementación con factor X o factor X activado (es decir, factor Xa). La razón de la eficacia del concentrado de factor X es que elevando la concentración en plasma de factor X, el equilibrio de la reacción se movería hacia la generación endógena de factor Xa, conduciendo por ello la reacción en cascada de coagulación hacia la formación de coágulo. La razón de la eficacia del concentrado de factor Xa es que la generación de trombina de protrombina sería conducida por el catalizador natural (factor Xa) aunque por infusión en lugar de confiar en las primeras etapas de activación del camino de coagulación.

El factor X o factor Xa preparado según el método de la invención y las composiciones de factor X o factor Xa de la invención, se pueden usar también como ayuda hemostática para pacientes que no tiene deficiencia de factor X pero que están padeciendo hemorragia o el riesgo de hemorragia. El tratamiento con factor X o factor X activado (factor Xa) puede servir para corregir el desequilibrio hemostático, promoviendo de este modo la coagulación.

El factor X preparado según el método de la invención y las composiciones de factor X de la invención se pueden usar también para la inversión del anticoagulante. Algunos anticoagulantes funcionan empobreciendo el plasma en factores de coagulación funcionales. A veces es necesario invertir este efecto tan rápido como sea posible, por ejemplo, para permitir cirugía de emergencia. Esto se consigue actualmente inyectando concentrado de complejo de protrombina (PCC) que es una mezcla de factores de coagulación. Sin embargo, cuando el equilibrio de factores de coagulación en el PCC no es equiparable al equilibrio en pacientes anticoagulados, puede haber riesgos asociados a la pérdida del control hemostático cuando se infunde el PCC. El uso de concentrado de factor X, posiblemente junto con otros factores de coagulación purificados, puede proporcionar mejor control de coagulación en un paciente.

El factor X inactivado se puede usar para el tratamiento de pacientes con una tendencia trombótica. Algunos pacientes tienen una tendencia trombótica o estado hipercoagulable que se puede tratar con anticoagulantes. Históricamente la elección de tratamiento ha estado limitada a warfarina y sus análogos (que inhiben la carboxilación de factores de coagulación dependientes de vitamina K formadores de coágulo) o heparina y sus análogos (que catalizan la inhibición de factores de coagulación activados por inhibidores de proteasa). Algunos estados (por ejemplo, embarazo o cirugía) no favorecen el uso de estas terapias, debido a la preocupación acerca de la toxicidad o porque complican la rápida medida y control de problemas de hemorragia aguda. El tratamiento con un concentrado de factor X inactivado podría reducir la tendencia trombótica por acción anticoagulante. La ventaja del tratamiento con un concentrado de factor X inactivado purificado es que habría muy poco de otra proteína presente que pudiera provocar efectos secundarios indeseados.

5 La razón de este tratamiento es que un factor X apropiadamente inactivado no tendría capacidad catalítica para convertir protrombina en trombina (debido a la desnaturalización del sitio activo del factor X) pero retendría la capacidad para unirse a los sustratos naturales en la sangre. El factor X inactivado competiría por estos sitios con el factor X activo endógeno. Si se administrara a una dosis apropiada, el factor X inactivado podría saturar los sitios del sustrato, reduciendo la expresión del sistema de coagulación.

10 El factor X inactivado o factor Xa inactivado es preferentemente por lo menos 30% en peso, más preferentemente por lo menos 70% en peso de la proteína total presente en cualquier composición farmacéutica, y lo más preferentemente es la única proteína presente. La composición puede estar en forma de disolución congelada, en forma líquida o liofilizada, pero está preferentemente liofilizada para maximizar la vida útil. Las composiciones liofilizadas son también preferibles ya que se pueden someter a una etapa de tratamiento térmico en seco para la inactivación de virus.

15 Cualquier método de inactivación que provoca desnaturalización del sitio activo del factor X sin destruir la capacidad del factor X para unirse a sustratos naturales en la sangre se puede usar para inactivar el factor X o factor Xa. Por ejemplo, el factor X (o factor Xa) se pueden inactivar por calor (por ejemplo, a 60°C en disolución durante >20 horas, o a 80°C durante 72 horas después de liofilización en una formulación que vuelve el factor X más susceptible a la inactivación, por ejemplo, una formulación que contiene polivinilpirrolidona, o polietilenglicol, o baja fuerza iónica y/o alto contenido de azúcar), por exposición a una fuente de radiación gamma, o por reacción con compuestos químicos desnaturalizantes o reticuladores. La inactivación se puede verificar ensayando para ver la actividad del factor X antes y después del tratamiento. Cualquier factor X o factor Xa se podría inactivar para su uso como
20 anticoagulante. Preferentemente, el factor X o factor Xa se prepararía según el método de la invención o sería una composición de factor X o factor Xa según la invención. De este modo, en otro aspecto, los métodos de la invención comprenden adicionalmente una etapa de inactivación para inactivar el factor X o el factor Xa.

25 La administración de factor X, factor Xa, factor X inactivado o factor Xa inactivado a un paciente será normalmente administración por vía intravenosa de una disolución apropiada. Se pueden usar otras rutas de administración (por ejemplo, subcutánea, oral) en presencia de un vehículo apropiado, pero la respuesta clínica puede ser retrasada y/o reducida y de este modo se prefiere la administración intravenosa. Los regímenes de dosificación dependerán del paciente y del estado que se está tratando y del modo de administración. En estados críticos tales como deficiencia de factor X, serán necesarios tratamientos repetidos. Para otros estados, puede ser suficiente un solo tratamiento.

30 Se pueden usar los siguientes métodos de ensayo para medir la actividad de la proteína en los métodos de la invención.

Ensayo de coagulación para el Factor X

35 El factor X se puede medir en un ensayo de coagulación que usa plasma deficiente en factor X como sustrato. Se añade material de ensayo al plasma a dilución(es) predeterminada(s) y se mide el tiempo de coagulación del plasma después de la re-calcificación. El tiempo de coagulación se compara a continuación con los tiempos de coagulación obtenidos de disoluciones de una preparación estandarizada de factor X (por ejemplo, el estándar internacional de la WHO para factores II, IX y X) y se interpola la concentración de factor X.

Ensayo cromogénico para el Factor X

40 El factor X se puede medir activando primero el factor X con activador específico del factor X de veneno de víbora de Russell y determinando a continuación el incremento de absorbancia debido al desprendimiento de un cromóforo de un sustrato de péptido cromógeno comercial (por ejemplo, Chromogenix S2765). Esto se compara a continuación con el cambio de absorbancia obtenida de diluciones de una preparación de factor X estandarizada (por ejemplo, el estándar internacional de la WHO para factores II, IX y X) y se interpola la concentración de factor X.

Ensayo antigénico para el Factor X (ELISA)

45 El antígeno del factor X se puede medir por ensayo de inmunosorbente ligado a enzima con anticuerpos específicos del factor X, uno de los cuales está conjugado con una enzima peroxidasa. La adición de un sustrato específico de peroxidasa da como resultado el desprendimiento de un cromóforo. Esto se compara a continuación con el cambio de absorbancia obtenida de diluciones de una preparación de factor X estandarizada (por ejemplo, el estándar internacional de la WHO para factores II, IX y X) y se interpola la concentración de factor X.

Ensayo cromogénico para protrombina

50 La protrombina se puede medir primero activando la protrombina con Ecarina y a continuación determinando el incremento de absorbancia debido al desprendimiento de un cromóforo de un sustrato de péptido cromógeno comercial (por ejemplo, Chromogenix S2238). Esto se compara a continuación con el cambio de absorbancia obtenido de diluciones de una preparación estandarizada de protrombina (por ejemplo, el estándar internacional de la WHO para factores II, IX y X) y se interpola la concentración de protrombina.
55

Ensayo de proteína

El ensayo BCA de Pierce combina la bien conocida reducción de Cu^{2+} a Cu^+ por proteína en un medio alcalino (reacción de biuret) con la altamente sensible y selectiva detección colorimétrica del Cu^+ usando un único reactivo que contiene ácido bicinconínico.

- 5 La invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Separación de protrombina de factor X usando cromatografía de quelato metálico

- 10 Se aplicó complejo de protrombina a una columna de Sefarosa quelante que se había cargado con iones cobre. Después de lavar con tampón de citrato 50mM, fosfato 50 mM y cloruro de sodio 500 mM a pH 6,5, se recuperó factor X por elución con tampón que contiene citrato 50 mM, fosfato 50 mM y cloruro de sodio 100 mM a pH 7,0. Se recogieron fracciones iguales consecutivas de la primera elevación observada de absorbancia del eluato a 280 nm hasta el retorno a la línea base. Se midió en cada fracción el factor X y la protrombina. Los resultados se muestran en la Tabla 1-1

Tabla 1-1. Elución de factor X y protrombina de cromatografía de quelato metálico

Fracción	Factor X, ui/ml	Protrombina, ui/ml	Protrombina, ui por unidad de factor X
1	17,3	0,49	0,028
2	19,7	0,37	0,019
3	18,7	0,22	0,012
4	21,1	0,17	0,008
5	19,7	0,13	0,006
6	22	0,10	0,005
7	18,4	0,08	0,004
8	17,4	0,07	0,004
9	16,2	0,06	0,004
10	16	0,06	0,003
11	13,6	0,005	0,004
12	13,7	0,05	0,003
13	12,8	0,04	0,003

- 15 Este ejemplo demuestra que mientras que el contenido de factor X de cada fracción era razonablemente constante, el contenido de protrombina cayó significativamente después de unas pocas fracciones.

Ejemplo 2: Purificación adicional de factor X por cromatografía de intercambio aniónico

- 20 El eluato rico en factor X de la cromatografía de quelato metálico se diluyó para reducir la fuerza iónica, a continuación se aplicó a una columna de DEAE-Sefarosa, que se había llenado y equilibrado en tampón de citrato y fosfato. La columna cargada se lavó con el mismo tampón de equilibrado y a continuación se eluyó con tampón de citrato-fosfato que contiene cloruro de sodio. El eluato se recogió y ensayó para ver el factor X y la protrombina. Las diferentes composiciones de tampón se muestran en la Tabla 2-1 y los resultados se muestran en la Tabla 2.2. Estas muestran como las condiciones del tampón se pueden modificar para retirar protrombina del factor X, siendo realizaciones preferidas de la invención tanto la reducción de fosfato como de pH.

Tabla 2-1. Composiciones de tampón usadas para diferentes experimentos

Experimento	Tampón de equilibrado, mM			
	Citrato	Fosfato	NaCl	pH
A	10	0	100	6,0
B	10	10	100	7,0
C	10	0	100	6,0
D	10	0	100	6,0

Experimento	Tampón de elución, mM			
	Citrato	Fosfato	NaCl	pH
A	10	10	310	7,0
B	10	10	310	7,0
C	12	0	310	6,5
D	10	10	310	7,0

Tabla 2.2. Separación de factor X de protrombina usando diferentes formulaciones de tampón

Experimento	Eluato			
	Factor X, ui/ml	Protrombina, ui/ml	Protrombina, ui por ui de factor X	Factor de reducción de protrombina
A	204	0,075	0,00037	23 veces
B	673	2,35	0,0035	2,4 veces
C	162	0,034	0,00021	40 veces
D	259	0,50	0,0019	2,9 veces

5

Ejemplo 3: Retirada mejorada de protrombina por cromatografía de quelato metálico

Se aplicó complejo de protrombina tratado con detergente/disolvente a una columna de Sefarosa quelante que se había cargado con iones cobre. Después de lavar con tampón de citrato 50 mM, fosfato 50 mM y cloruro de sodio 500 mM de pH 6,5, se recuperó factor X por elución con tampón que contiene tampón de citrato 50 mM, fosfato 50 mM y cloruro de sodio 100 mM de pH 7,0. El factor X se recogió bien cuando la absorbancia del eluato a 280 nm empezaba a incrementarse hasta cuando había retornado a la línea base (Método A, como se describe en el documento WO 89/05650) o bien para una cantidad de 3,3 volúmenes de lecho de gel empezando por 1,2 volúmenes de lecho de gel después del aumento de absorbancia del eluato (Método B según la invención). Los resultados se muestran en la Tabla 3-1.

10

15 Tabla 3-1. Composición media del eluato de quelato metálico recogido por diferentes métodos

Método	Factor X, ui/ml	Protrombina, ui/ml	Protrombina, ui por ui de factor X	Factor de retirada de protrombina
A (n=7) (comparativo)	15,9	0,42	0,026	-
B (n=6)	16,8	0,12	0,007	3,7 veces

Ejemplo 4: Purificación adicional y formulación de factor X para dar productos activos y no activos

5 Se preparó factor X por purificación de complejo de protrombina tratado con detergente/disolvente usando el método de cromatografía de quelato metálico de la invención. El factor X se aplicó a continuación a una columna de DEAE-Sefarosa FF equilibrada en tampón de citrato que contiene cloruro de sodio 100 mM a pH 6,0. El factor X se eluyó en forma de un único pico usando un tampón de citrato-fosfato que contiene cloruro de sodio 310 mM a pH 7,0.

10 El eluato de factor X se formuló con tampón que contiene diferentes estabilizantes potenciales, se dispensó en viales de vidrio y se liofilizó. Al completar la liofilización, se sellaron los viales y a continuación se sometieron al procedimiento de inactivación de virus calentando a 80°C durante 72 horas. El material de partida y el producto se reconstituyeron a continuación y se ensayaron. Se midió el tiempo de reconstitución, el aspecto de la disolución y el rendimiento de factor X. El rendimiento de factor X es la evidencia de la capacidad de la proteína retenida para la activación (alto rendimiento) o la cantidad de inactivación/desnaturalización de proteína (bajo rendimiento). La Tabla 4-1 muestra formulaciones que dieron como resultado buenas propiedades de reconstitución y rendimiento de la actividad de factor X. La Tabla 4-2 muestra formulaciones que dieron como resultado inactivación del factor X (bajo rendimiento), apropiadas para la preparación de un producto de factor X inactivado.

15 Tabla 4-1. Formulaciones que dan como resultado buena reconstitución y rendimiento de factor X

Formulación	Tiempo de reconstitución, segundos	Aspecto de la disolución	Rendimiento de factor X, %
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 7,3 + 0,5% de sacarosa	<25	Transparente	74
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 7,3 + 1% de sacarosa	<20	Transparente	88
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 210 mM, pH 6,5 + 0,5% de sacarosa	<20	Transparente	70
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 6,8 + 2% de sacarosa	<20	Transparente	78
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 7,0 + 1% de sacarosa	25	Transparente	84
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 7,3 + 2% de sacarosa	<20	Transparente	84
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 300 mM, pH 7,3 + 0,5% de sacarosa	<25	Transparente	74
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 300 mM, pH 7,3 + 3% de sacarosa	<20	Transparente	73
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 400 mM, pH 7,3 + 1% de sacarosa	<20	Transparente	77
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 400 mM, pH 7,3 + 1,5% de sacarosa	<25	Transparente	81
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 300 mM, pH 7,3 + 1% de trehalosa	<20	Transparente	92
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 300 mM, pH 7,3 + 3% de trehalosa	<20	Transparente	82
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 270 mM, pH 6,0 + 1% de trehalosa, 1% dextrano 35-45K	<25	Transparente	72
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 7,0 + glicina 20 mM	<20	Transparente	52

Tabla 4-2. Formulaciones que dan como resultado la inactivación del factor X

Formulación	Tiempo de reconstitución, segundos	Aspecto de la disolución	Rendimiento de factor X, %
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 240 mM, pH 6,5 + 3% de sacarosa	45	Transparente	1,6
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 200 mM, pH 6,5 + 3% de sacarosa	>300	Transparente	0
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 200 mM, pH 7,3 + 3% de sacarosa	>300	Transparente	0,5
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 200 mM, pH 6,8 + 3% de sacarosa	>300	Transparente	0,8
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 7,0 + 1% de sorbitol	>600	Precipitado coloreado	0,8
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 7,0 + 1% de PVP 40K	48	Transparente	13
Citrato 10mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 7,0 + 1% de PEG 4000	<20	Transparente	27

(En la Tabla 4-2, PVP = polivinilpirrolidona, y PEG = polietilenglicol).

Ejemplo 5: Demostración de que el factor X inactivado inhibirá el procedimiento de coagulación

- 5 Factor X preparado por el método de la invención se desactivó calentando en disolución a 60°C durante >20 horas. La inactivación se verificó ensayando para ver la actividad del factor X antes y después del tratamiento.

Se usaron dos ensayos de coagulación de laboratorio clínico estándar para determinar el efecto de añadir el factor X inactivado a plasma mezclado normal. Se mezclaron 50 µl de factor X inactivado con 50 µl de plasma normal humano mezclado. 50 µl de factor X completamente funcional o tampón de formulación de factor X se substituyeron por el factor X inactivado en algunos ensayos para servir como control positivo y negativo respectivamente. Como control adicional, se usó calcio adicional en un conjunto de ensayos para superar la posible quelación del calcio por iones citrato en el tampón de formulación de factor X. Las muestras se ensayaron a continuación con el ensayo de tiempo de protrombina (PT) o el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT). Estos dos ensayos están bien establecidos en los laboratorios de hematología y coagulación donde se usan para distinguir entre los defectos clínicos en los mecanismos de coagulación extrínseco o intrínseco.

Método PT: 50 µl de muestra de ensayo y 50 µl de plasma se incubaron durante 60 segundos, a continuación se añadieron 100 µl de Neoplastina Stago (tromboplastina de cerebro de conejo + cloruro de calcio). Se midió el tiempo de coagulación.

- 20 Método APTT: 50 µl de muestra de ensayo y 50 µl de plasma se mezclaron con 50 µl de DAPTTIN (caolín, sulfátido + fosfolípido altamente purificado) y se incubaron durante 180 segundos. Se añadieron 100 µl de cloruro de calcio 25 mM y se midió el tiempo de coagulación.

Los resultados se muestran en las Tablas 5-1 y 5-2.

Tabla 5-1: Tiempo de protrombina

	Factor X desactivado a 100 ui/ml en tampón de formulación	Factor X a 100 ui/ml en tampón de formulación	Tampón de ensayo
	(s)	(s)	(s)
Sin dilución de la muestra	34,7	21,6	15,2
Dilución 1:10	16,3	15,5	
Dilución 1:100	13,8	15,0	
CaCl₂ 10 mM añadido			
Sin dilución de la muestra	32,9	17,6	
Dilución 1:10	16,9	14,5	
Dilución 1:100	14,2	14,6	

Tabla 5-2: Tiempo de tromboplastina parcial activado

	Factor X desactivado a 100 ui/ml en tampón de formulación *	Factor X a 100 ui/ml en tampón de formulación	Tampón de formulación	Tampón de ensayo
	(s)	(s)	(s)	(s)
Sin dilución de la muestra	70,3	41,2	37,7	33,00
Dilución 1:10	33,1	31,3	31,5	
Dilución 1:100	32,1	30,7	33,9	
CaCl₂ 10 mM añadido				
Sin dilución de la muestra	60,5		22,5	
Dilución 1:10	35,8		31,9	
Dilución 1:100	32		32,1	

- 5 Estos resultados muestran que tanto el tiempo de protrombina como el tiempo de tromboplastina parcial activado se prolongaron por la adición del factor X inactivado de una manera dependiente de la dosis. El efecto era atribuible al factor X inactivado. No se vio efecto sobre el PT con factor X activo nativo y solo se vio un efecto mucho más pequeño sobre el APTT con factor X activo nativo. Los tampones de sales no tenían efecto sobre ninguno de los ensayos.

Ejemplo 6. Purificación adicional del factor X por cromatografía de intercambio aniónico

- 10 El factor X que se había eluido de una columna de IMAC cargada con complejo de protrombina, cargada con cobre se diluyó hasta una conductividad de 15 mS/cm a pH 6,0. Se aplicó a una columna precargada con intercambiador aniónico de flujo rápido de DEAE-Sefarosa. La columna cargada se lavó a continuación con tampón de equilibrado de gel (aproximadamente citrato 10,5 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 6,0). La composición tampón se ajustó a continuación lavando aproximadamente con citrato 10 mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 6,0 antes de eluir la proteína unida con aproximadamente citrato 10 mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 310 mM, pH 7,0. Se recogieron fracciones del pico de elución de proteína y se ensayaron para ver los factores X, II y IX. Los resultados se expresaron como porcentaje de la actividad máxima (en ui/ml) para cada proteína (Figura 1). Los resultados mostraron que la elución del factor II y factor IX es retardada por esta etapa de intercambio aniónico. La etapa se puede usar para separar el factor X del factor II y factor IX por recogida selectiva de fracciones.

20 Ejemplo 7: Activación del factor X y su uso para puentear la función del factor VIII

Se activó el eluato de factor X producido por cromatografía de intercambio aniónico secuencial de plasma empobrecido crioprecipitado, cromatografía en gel quelante cargado con cobre y adicional cromatografía de intercambio aniónico. La

activación se consiguió por incubación del eluato rico en factor X con cloruro de calcio 25 mM y 0,01 u/ml de veneno-X de víbora de Russell a pH 7,4 a 37°C. El factor X activado se midió usando un ensayo de sustrato cromógeno para factor X sin la adición de activador de ensayo. La actividad se determinó por interpolación de una línea de calibración estándar generada con un estándar para factor X y el activador de ensayo normal.

- 5 El factor X activado se ensayó en un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activado con caolín usando plasma deficiente en factor VII como sustrato (50 µl de plasma deficiente en factor VIII + 50 µl de tampón de ensayo + 50 µl de reactivo daptin TC incubado a 37°C durante 180 segundos antes de la adición de 100 µl de la muestra de ensayo). Los tiempos de coagulación se midieron y compararon con los de las muestras de control que contenían solo los activadores del factor X o factor X no activado. Los resultados mostrados en la Tabla 7-1 demuestran que (a) el factor X se puede activar con cloruro de calcio o con una combinación de cloruro de calcio y RVV-X; (b) el factor X activado sustancialmente acorta el tiempo de coagulación y este acortamiento es mayor que el conseguido por cualquiera de los activadores de factor X equivalentes solos.

Tabla 7-1. Uso de factor X activado como un puente del factor VIII.

Iniciador de coagulación (los componentes reaccionaron conjuntamente durante 30 minutos a 37°C antes de la adición al sustrato de APTT)	Tiempo medio de coagulación APTT deficiente en F VIII (segundos)
Cloruro de calcio 25 mM	107,0
10 ui/ml de factor X + cloruro de calcio 25 mM + 0,01 u/ml de RVV-X	6,7
10 ui/ml de factor X + cloruro de calcio 25 mM	60,7
Cloruro de calcio 25 mM + 0,01 u/ml de RVV-X	23,7

15 **Ejemplo 8: Preparación del factor X**

Se aplicó concentrado de complejo de protrombina tratado con detergente/disolvente a una columna de flujo rápido de sefarosa cargada de cobre en una disolución que contiene cloruro de sodio 0,5 M. La columna se lavó con tampón de citrato y fosfato de pH 6.5 que contiene cloruro de sodio 0,5 M. La proteína factor X se eluyó a continuación con tampón de citrato y fosfato de pH 7,0 que contiene cloruro de sodio 0,1 M. Se desechó la proteína eluida en los 1,2 primeros volúmenes de lecho de gel. Se recogió la proteína factor X eluida en los siguientes 3,3 volúmenes de lecho de gel. La conductividad de esta disolución de factor X se redujo a 10-18 mS/cm y el pH se redujo a 6.0, a continuación se aplicó la disolución a una columna de gel de intercambio aniónico de flujo rápido de DEAE Sefarosa. La columna se lavó a continuación con tampón de citrato que contiene cloruro de sodio 0,15 M. Se eluyó a continuación factor X purificado con tampón de citrato y fosfato de pH 7,0 que contiene cloruro de sodio 0,31 M. El factor X se pasó a través de un filtro de retención de virus de 15 nm Planova, se formuló con sacarosa al 1% peso/peso, se diluyó hasta una potencia objetivo de 130 ui de factor X por ml y se liofilizó. Los viales de factor X liofilizado se sellaron a vacío, a continuación se calentaron a 80°C durante 72 horas en un horno de aire caliente. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Purificación del factor X

	Factor X, ui/ml	Factor II, ui por 100 ui de FX	Actividad específica, ui/mg de proteína	Rendimiento de la etapa, %
S/D PCC	41,9	110	3,5	100
Eluato de quelato metálico	12,7	0,88	109	24
Eluato de intercambio iónico	251	0,42	135	94
Filtrado de virus	227	0,47	130	99
Factor X liofilizado	130	0,51	131	87
Factor X tratado térmicamente	122	0,50	115	94

30 **Ejemplo 9: Preparación de factor X activado**

El factor X se preparó como se describe en el Ejemplo 8 anterior y se diluyó hasta aproximadamente 10 ui/ml. La disolución se mezcló a continuación con gel de sefarosa al que se ha copulado la proteína de activación de factor X

del veneno de víbora de Russell (RVV-X). La activación ocurrió cuando el factor X se incubó con la Sefarosa-RVV-X durante hasta 3 horas y la disolución de factor X activado se separó a continuación de la Sefarosa-RVV-X. La activación se demostró por la aparición de la banda del factor Xa en el experimento de SDS-PAGE en condiciones reducidas. La actividad se midió usando un ensayo del factor X en el que el activador normal se había omitido y reemplazado con tampón de ensayo. Una unidad de factor X activado (FXa) se definió como la actividad después de la activación completa de una unidad internacional de factor X. La presencia de factor X nativo no activado se midió realizando el ensayo de rutina de factor X que contiene activador. Los resultados (mostrados en la Tabla 9) confirmaron que se consiguió más del 90% del máximo de activación.

Tabla 9

Muestra de ensayo	Actividad del factor X sin activador del ensayo, ui/ml	Actividad del factor X con activador del ensayo, ui/ml
Material de partida del factor X	No medido	9,2
Sobrenadante del gel del factor X	5,9	6,3

Ejemplo 10: Uso de factor X activado para puentear la función de coagulación del factor VIII

Se preparó factor X activado como se describe en el Ejemplo 9 anterior. Se añadieron distintas concentraciones a un sistema de ensayo de APTT modificado en el que sustrato de plasma normal se había reemplazado con plasma deficiente en factor VIII. Los resultados se muestran en la Tabla 10. La adición de tampón o factor X inactivado (preparado como se describe en el Ejemplo 11) no corrigió los prolongados tiempos de coagulación. La adición de factor X activado consiguió parámetros de coagulación normales cuando se añadió a una concentración de entre 0,02 y 0,05 u/ml.

Tabla 10. Tiempos de coagulación en plasma de sustrato deficiente en factor VIII

	Tiempo de coagulación, segundos
Muestra	
Plasma de referencia	47,4
Tampón	121,8
Factor X inactivado, 20 u/ml*	105,5
Cloruro de calcio 5 mM	121,8
Factor X activado:	
0,0005 u/ml	108,2
0,001 u/ml	107,7
0,025 u/ml	94,2
0,005 u/ml	86,9
0,01 u/ml	72,0
0,02 u/ml	59,2
0,05 u/ml	39,7
0,1 u/ml	26

*la cantidad de factor X inactivo obtenido de 20 ui/ml de factor X.

Ejemplo 11: Preparación de factor X inactivado

Se preparó factor X por purificación de concentrado de complejo de protrombina tratada con detergente/disolvente por cromatografía de quelato metálico cargado con cobre seguido de cromatografía de intercambio iónico como se describe en los ejemplos precedentes. El factor X a 100 ui/ml y 10 ui/ml se inactivó a continuación por incubación a 60°C durante hasta 20 horas. La inactivación del factor X se midió por el ensayo del tiempo de coagulación (Tabla 11). Un tiempo de coagulación de 40 segundos se aproxima a 0,07 ui de factor X/ml. Estos resultados muestran que

quedaba mucho menos de 0,07 ui/ml de actividad después de 21 horas. De este modo, se consiguió sustancialmente más del 99,9% de inactivación.

Tabla 11. Tiempos de coagulación (segundos) para la actividad de factor X durante el proceso de inactivación

Concentración de partida de factor X	Tiempo de calentamiento, horas				
	0 h	0,5 h	2 h	4 h	21 h
100 ui/ml	25,9	32,7	60	89,8	>150
10 ui/ml	31,0	32,1	35,3	50,8	>150

5 **Ejemplo 12: Uso de factor X inactivado para inhibir la coagulación**

Se preparó factor X inactivado (FX-IN) calentando producto de factor X a 60°C durante 20 horas. El factor X activado (FXa) se diluyó y mezcló con distintas concentraciones de factor X inactivado, antes de añadir al substrato en el ensayo de generación de trombina (TGA). Los resultados se muestran en la Tabla 12. Esta muestra que el efecto coagulante de 0,05 u/ml de FXa puede ser anulado por la presencia de entre 5 y 10 unidades de factor X inactivado, equivalentes a aproximadamente un exceso de 10-20 veces de factor X inactivo sobre factor X activado.

Tabla 12. Inhibición de la coagulación por factor X inactivado

Muestra	Tiempo medio de retraso (minutos)	Área bajo la curva	Índice de velocidad
Tampón	17,0	2051	1,6
FXa, 0,1 u/ml ¹	9,0	3535	7,6
FXa, 0,05 u/ml ¹ +			
+ FX-IN 0,5 u/ml ²	12,5	3290	5,1
+ FX-IN 2,5 u/ml ²	14	3016	6,2
+ FX-IN 5,0 u/ml ²	13,5	2884	5,6
+ FX-IN 10 u/ml ²	23,0	1544	1,4
+ FX-IN 25 u/ml ²	22,5	599	0,7
+ FX-IN 50 u/ml ²	54,5	186	0,3

¹ 1 unidad de FXa se define como la cantidad obtenida de 1 unidad internacional de factor X después de la activación completa.

² 1 unidad de Factor X inactivo se define como la cantidad obtenida de 1 unidad internacional de factor X funcional.

15 **Ejemplo 13: Ausencia de trombogénicidad en la preparación de Factor X**

Se preparó factor X como se describe en el Ejemplo 8. El producto se ensayó usando un modelo de trombogénicidad de estasis de conejo in vivo. El efecto del Factor X a tres dosis (100, 200 y 400 iu/kg de peso corporal) se comparó con el efecto de un control negativo salino fisiológico. Se incluyó un control positivo de trombina (50 ui/kg de peso corporal) para demostrar que el sistema de ensayo podría detectar un ataque trombogénico. Los productos se infundieron en una vena marginal de la oreja y se dejó que entraran en la circulación durante 30 segundos. Se aisló entonces una sección de la vena yugular por ligadura y se evaluó la cantidad de formación de trombina 15 minutos después. Los resultados no mostraron diferencia estadística entre los conejos que reciben dosis de factor X y los conejos que reciben el control negativo salino.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la separación de factor X humano de un material de partida que comprende factor X y protrombina, comprendiendo el método
 - 5 a) adsorber el material de partida sobre un sustrato de cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado;
 - b) eluir las proteínas adsorbidas seleccionadas del sustrato por reducción de la fuerza iónica y/o cambio del pH del tampón de elución;
 - 10 c) monitorizar el eluato para ver el comienzo de la elución de protrombina y factor X, desechando una primera porción del eluato y recogiendo una segunda porción subsecuente del eluato enriquecida en factor X; y
 - d) retirar la protrombina residual en el factor X obtenido en la etapa c) por cromatografía de intercambio aniónico.
2. Un método según la reivindicación 1 que comprende adicionalmente por lo menos una etapa para la reducción o inactivación de virus.
- 15 3. Un método según la reivindicación 1 que comprende:
 - i) tratamiento con detergente/disolvente del material de partida que comprende factor X y protrombina;
 - ii) adsorber el material de partida tratado con detergente/disolvente sobre un sustrato de cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado;
 - iii) eluir proteínas adsorbidas del sustrato;
 - 20 iv) monitorizar el eluato para ver el comienzo de la elución de protrombina/factor X, desechando una primera porción del eluato y recogiendo una subsecuente segunda porción del eluato enriquecida en factor X;
 - v) retirar la protrombina residual en la segunda porción del eluato llevando a cabo cromatografía de intercambio aniónico;
 - 25 vi) filtrar el producto de la etapa v) a través de un filtro de retención de virus;
 - vii) liofilizar el producto filtrado de la etapa vi), opcionalmente en presencia de uno o más estabilizantes; y
 - viii) someter el producto liofilizado a una etapa de tratamiento térmico de inactivación/reducción de virus.
4. Un método según cualquier reivindicación precedente en el que el material de partida es una fracción de plasma.
- 30 5. Un método según cualquier reivindicación precedente en el que el material de partida es un complejo de protrombina.
6. Un método según cualquier reivindicación precedente que comprende adicionalmente una etapa de activación para activar el factor X.
- 35 7. Un método según la reivindicación 6, en el que el factor X es activado por un ion metálico divalente solo o en combinación con un veneno.
8. Un método según la reivindicación 7, en el que el ion metálico divalente es calcio.
9. Un método según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que el veneno es veneno de víbora de Russell.
10. Un método según cualquier reivindicación precedente que comprende adicionalmente una etapa de inactivación para inactivar factor X o factor X activado.
- 40 11. Un método según cualquier reivindicación precedente que comprende adicionalmente preparar una composición farmacéutica que comprende el factor X o factor Xa y uno o más diluyentes, excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables.
12. Un método según la reivindicación 11, en el que el estabilizante es sacarosa, trehalosa, dextrano, glicina, polivinilpirrolidona o polietilenglicol.
- 45 13. Un método según la reivindicación 11 o 12, en el que la composición es una composición liofilizada.

14. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el material de partida es una disolución recogida de un tejido transgénico.
15. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el material de partida es una disolución recogida de un medio de cultivo recombinante.

Figura 1. Perfil de elución para los factores X, II y IX durante la cromatografía de intercambio iónico

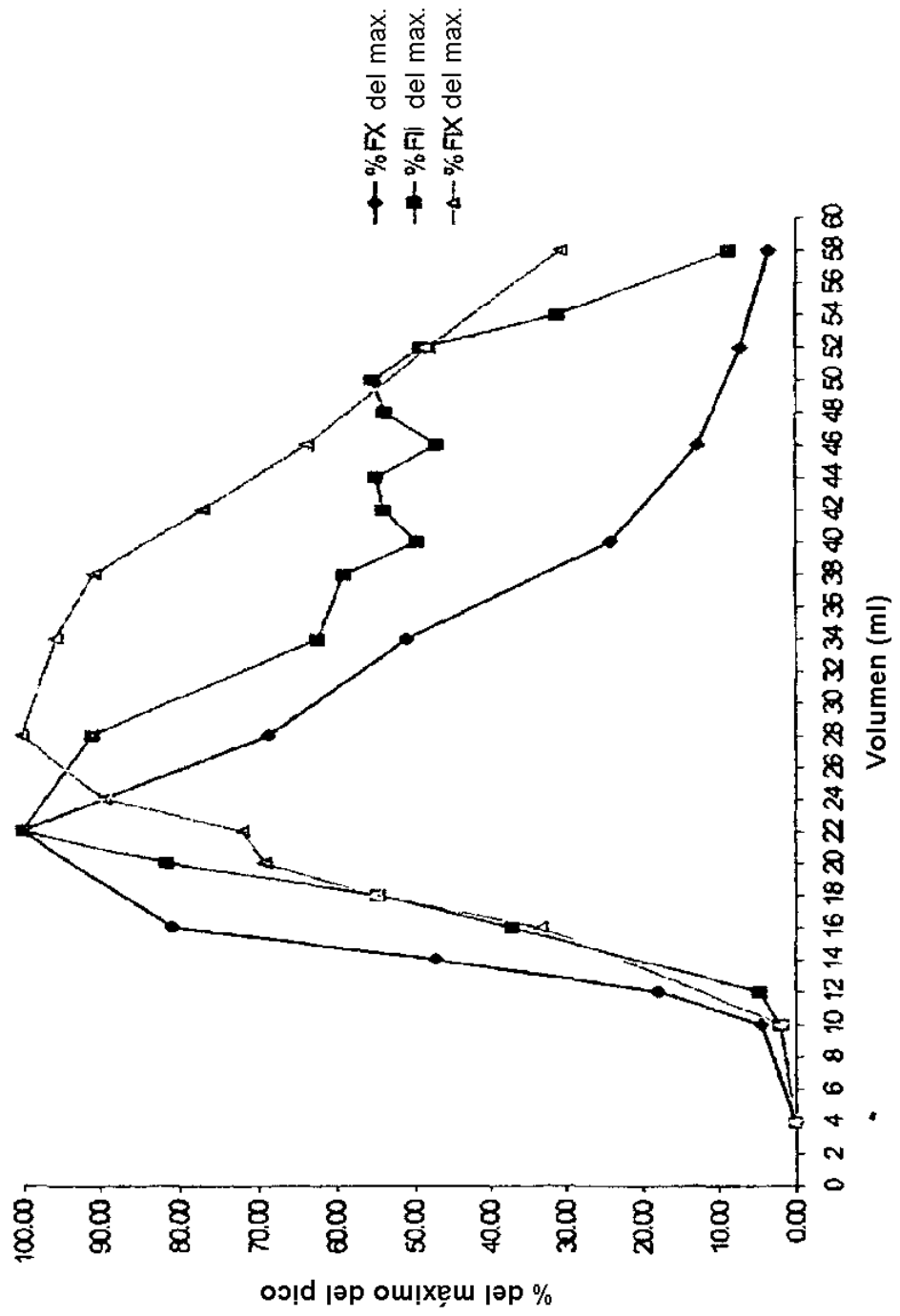


Figura 2. Diagrama de flujo del procedimiento preferido

