

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 888**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/75** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2005 E 10182320 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 2264069**

54 Título: **Purificación de un fibrinógeno**

30 Prioridad:

**24.02.2004 DE 102004009400**

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

**28.06.2013**

73 Titular/es:

**CSL BEHRING GMBH (100.0%)  
Emil-von-Behring-Strasse 76  
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es:

**FEUSSNER, ANNETTE;  
GAWANTKA, VOLKER;  
LEMMER, JÖRG;  
LIEBING, UWE;  
METZNER, HUBERT y  
SCHULTE, STEFAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 409 888 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

## Purificación de un fibrinógeno

- 5 El presente invento se refiere a un procedimiento para la purificación de un fibrinógeno, que **está caracterizado porque** contiene una o varias etapas de procedimiento, en las que una o varias proteínas contaminantes se empobrecen mediante una cromatografía negativa y/o una adsorción negativa, en cada caso mediando utilización de un gel de un colorante.
- 10 Un fibrinógeno desempeña un cometido clave en el caso de la coagulación de la sangre. En el caso de traumatismos o de operaciones quirúrgicas, casi siempre son dañados algunos vasos sanguíneos, y resultan hemorragias. Mediante la coagulación de la sangre, esta sangre se solidifica en la zona de heridas más pequeñas, y la hemorragia pasa a detenerse. El sistema de coagulación protege al cuerpo de este modo frente a altas pérdidas de sangre. En el caso de la coagulación de la sangre, el fibrinógeno soluble que está contenido en el plasma sanguíneo, es transformado en presencia de trombina en la fibrina insoluble, de tipo fibroso. Si falta fibrinógeno, entonces la
- 15 coagulación de la sangre no funciona correctamente. Se puede compensar este defecto administrando un fibrinógeno, que ha sido aislado p.ej. a partir de un plasma sanguíneo humano. A causa de su importancia para la hemóstasis y la cicatrización de las heridas, un fibrinógeno tiene una alta importancia en el uso clínico.
- 20 Debido a esta alta importancia clínica de un fibrinógeno, en la bibliografía hay numerosas referencias, que se ocupan de diferentes métodos para la purificación de esta importante proteína. La purificación de un fibrinógeno se efectúa predominantemente a partir de un plasma humano, más raramente también a partir de un plasma animal. Asimismo, es posible realizar una purificación de un fibrinógeno producido por vía recombinante, p.ej. a partir del cultivo de células después de una expresión recombinante, o también a partir de la leche de animales transgénicos.
- 25 El plasma humano contiene una compleja mezcla de más que 100 proteínas, constituyendo un fibrinógeno aproximadamente un 2 % de la cantidad total de proteínas. La purificación y el aislamiento de un fibrinógeno requieren, por lo tanto, por regla general, varias etapas, y las posibilidades de combinación de estas etapas individuales del procedimiento son muy numerosas y variadas.
- 30 Una parte componente importante de la purificación de un fibrinógeno procedente de un plasma humano es tradicionalmente la precipitación. Los métodos conocidos de precipitación utilizan unos aminoácidos tales como glicina o alanina, véanse, por ejemplo, el documento de patente europea EP 0 383 234, el documento de solicitud de patente internacional WO 01/48016 o la cita bibliográfica de Jakobsen & Kierulf (Thrombosis Research 3 (1973) 145-159), sulfato de amonio, véanse por ejemplo los documentos de patentes de los EE.UU. US 5.773.033, US 6.037.457 o la cita bibliográfica de Takeda (Journal of Clinical Investigation 45 (1966) 103-111), unos polímeros tales como, por ejemplo, un poli(etilenglicol) (PEG), véase, por ejemplo, el documento WO 95/25748 o la cita bibliográfica de Vila y colaboradores (Thrombosis Research 39 (1985) 651-656), etanol, véase, por ejemplo, el documento EP 0 408 029, en donde un fibrinógeno es precipitado con 5-10 % de etanol, y separado de otras proteínas plasmáticas, o el documento US 5.099.003, o la cita bibliográfica de Blombäck & Blombäck (Arkiv För Kemi 10 (1956) 415-443), unos polisacáridos sulfatados (SPS, p.ej. heparina), véanse por ejemplo los documentos WO 99/37680 y US 4.210.580, y unas soluciones con una pequeña fuerza iónica, véanse por ejemplo el documento US 4.188.318 y el documento de patente alemana DE 26 36 757.
- 40 Sin embargo, la pureza de un fibrinógeno, que se ha obtenido solamente sobre la base de unas precipitaciones, todavía no es suficiente para algunos usos, de tal manera que en el estado de la técnica se describen adicional o alternativamente diferentes etapas de adsorción y de cromatografía para la purificación de un fibrinógeno.
- 45 En el ámbito de la cromatografía por intercambio de iones se utiliza frecuentemente la cromatografía por intercambio de aniones. En este contexto se remite al documento EP 0 555 135, en el que un fibrinógeno es fijado en una etapa principal del procedimiento a una columna de intercambio de aniones, mientras que p.ej. una albúmina y unos agentes desactivadores no se fijan. El fibrinógeno se eluye a continuación a partir de la columna. En el documento WO 93/05067 se aprovecha la fijación de un fibrinógeno a intercambiadores de aniones, con el fin de eliminar de nuevo los detergentes que se han añadido para la desactivación de los virus. El documento WO 01/48016 describe la fijación de un fibrinógeno a un material de intercambio de iones mediando una utilización preferente de los  $\omega$ -aminoácidos que retardan la descomposición del fibrinógeno, tales como, por ejemplo, el ácido  $\epsilon$ -amino-caproico (EACA), en el tampón de aplicación y/o de lavado. Una tal etapa de procedimiento hace posible en particular un empobrecimiento eficiente del plasminógeno contaminante a partir de soluciones que contienen fibrinógeno.
- 50 La cromatografía con un intercambiador de cationes encuentra uso, por ejemplo, en la purificación de un fibrinógeno a partir de la leche de animales transgénicos, que se ha descrito en el documento WO 00/17234. También en este caso se escogen unas condiciones, que tienen como consecuencia la fijación del fibrinógeno al material de la columna y por consiguiente hacen posible la separación de p.ej. caseína.
- 60

La propiedad de la fijación del fibrinógeno a los intercambiadores de cationes se aprovecha en el documento WO 91/01808, con el fin de eliminar selectivamente fibrinógeno, lipoproteínas y urea a partir de unos líquidos tales como p.ej. la sangre.

5 En el documento WO 89/12065 se purifica un fibrinógeno en una etapa de procedimiento mediante una columna con heparina-Sepharose. Las condiciones se escogen de tal manera que el fibrinógeno sea adsorbido junto al material de la columna, y que de esta manera se puedan separar sobre todo albúminas, inmunoglobulinas y sustancias desactivadoras de los virus.

10 También se describe la posibilidad de purificar un fibrinógeno por medio de interacciones hidrófobas. En el documento WO 00/17239 la purificación de un fibrinógeno a partir de la leche de animales transgénicos se consigue en una etapa de procedimiento mediante fijación a una columna hidrófoba, en presencia de sales, con una subsiguiente elución. Asimismo, se menciona la posibilidad del uso de una columna hidrófoba para un fibrinógeno procedente de un plasma humano.

15 También se describen diferentes cromatografías por afinidad, que disponen de diferentes ligandos, que son capaces de fijar selectivamente a un fibrinógeno. En este contexto se ha de remitir p.ej. a los documentos US 6.037.457 o WO 99/05176, que describen unos anticuerpos, que fijan específicamente al fibrinógeno o a los péptidos del fibrinógeno, y que se pueden emplear, entre otras cuestiones, para la purificación de un fibrinógeno. Los documentos EP 0 789 030, US 5.723.579 y US 5.783.663 describen unos péptidos, que fijan a un fibrinógeno y que se pueden utilizar correspondientemente como ligandos en columnas de afinidad para la purificación de un fibrinógeno. Una ristocetina inmovilizada se empleó asimismo para la fijación de un fibrinógeno, y éste se eluyó de nuevo con urea 8 M (Suzuki y colaboradores, Thrombosis Research 18 (1980) 707-715). En el documento WO 99/20655 se utiliza finalmente una trombina desactivada como ligando para substratos de trombina, entre los que se cuenta también un fibrinógeno. En el documento WO 90/12803 se describe la denominada IMAC (acrónimo de "Immobilized Metal Affinity Chromatography" = cromatografía por afinidad con metales inmovilizados) para la purificación de determinadas proteínas. También se expone un fibrinógeno humano como una posible proteína, que se fija a la matriz de un compuesto quelato metálico. El fibrinógeno se fija también a una protamina-agarosa y se puede eluir a continuación en un pH ácido, véase, por ejemplo, el documento US 6.037.457 o la cita bibliográfica de Dempfle & Heene (Thrombosis Research 46 (1987) 19-27).

25 Todos/as estos/as procedimientos o etapas de procedimiento que se han expuesto tienen en común el hecho de que las condiciones se escogen de tal manera que un fibrinógeno se fije al material de cromatografía o respectivamente de adsorción, y a continuación, se tenga que desprender de nuevo desde el material en forma de gel.

30 Unos procedimientos, en los que un fibrinógeno pasa a través de la columna, se han descrito hasta ahora solamente para unos procedimientos, en los que se desea la separación del material de partida en diferentes "fracciones útiles" o en los que el fibrinógeno constituye una impureza.

35 Un plasma o material crioprecipitado contiene, junto a un fibrinógeno, también todavía grandes cantidades de otras proteínas plasmáticas clínicamente importantes, de tal manera que éste se utiliza también como un material de partida para el fraccionamiento y la obtención del factor VIII (F VIII), de la fibronectina y del factor de von Willebrand. Por este motivo, se llevan al uso también unas etapas cromatográficas de procedimiento, que son capaces de separar a la totalidad de las cuatro proteínas principales o por lo menos a dos de ellas. Para esto, se utilizan unos intercambiadores de aniones en unas condiciones, que no fijan a un fibrinógeno, pero sí, por ejemplo, al F VIII, al factor de von Willebrand y a la fibronectina, que a continuación se pueden eluir selectivamente mediante unas diferentes fuerzas iónicas. Acerca de esto se remite, por ejemplo, a los documentos WO 89/12065, EP 0 359 593 o US 5.252.709. En el documento EP 0 383 234, para los intercambiadores de aniones se escogen unas condiciones, en las que se fija solamente el F VIII, y por el contrario el factor de von Willebrand, la fibronectina y el fibrinógeno pasan a través de la columna o respectivamente permanecen en el material sobrenadante (procedimiento por tandas). Los documentos EP 0 408 029 y US 5.138.034 contienen finalmente, entre otros detalles, un procedimiento de fraccionamiento, en el que mediante un tratamiento de congelación y descongelación, el F VIII y la fibronectina se separan primeramente por precipitación, el factor IX (F IX) se adsorbe junto a una subsiguiente columna con un intercambiador de aniones y el fibrinógeno se precipita por medio de etanol desde el material que ha pasado por la columna. En todos estos casos, se trata de la separación de las proteínas principales importantes clínicamente, que pueden ser aportadas entonces, antes de su utilización farmacéutica, individualmente a otras etapas adicionales de purificación. En el documento EP 0 555 135 encuentra utilización una etapa similar de procedimiento con una columna que contiene un intercambiador de aniones también como una posible etapa intermedia en el caso de la purificación de un fibrinógeno para la eliminación del F VIII. En los documentos WO 96/02571 o respectivamente US 5.834.420, en una forma de realización para la purificación de un fibrinógeno, se emplea un material intercambiador de iones, de un modo parecido a como en el documento WO 89/12065, para la eliminación del F VIII y del factor de von Willebrand. No obstante, unas proteínas tales como el F VIII y el factor de von Willebrand no tienen ninguna influencia sobre la estabilidad del fibrinógeno. Frecuentemente, esta etapa de procedimiento se usa también en el caso de la producción de unos concentrados del F VIII, con el fin de liberar a éstos de un modo lo más completo que sea posible de contaminantes, tales como p.ej. inmunoglobulinas, fibronectina y fibrinógeno. En este contexto se ha de remitir, por ejemplo, a los documentos US 5.043.428 y EP 0 173 242. En el documento US 4.210.580 se describe un procedimiento para la purificación de fibronectina, en el que un fibrinógeno se puede separar después de la

precipitación con heparina, mediante lavado de una subsiguiente columna que contiene un intercambiador de aniones. También el documento US 5.099.003 aprovecha un intercambiador de aniones, pero en este caso para la eliminación de los factores II, VII, IX y X, que, en caso contrario, después de un tratamiento para la desactivación de los virus con  $\beta$ -propiolactona y de una irradiación con rayos UV, provocarían una gelificación y una formación de grumos en la solución que contiene fibrinógeno. En el documento DE 29 02 158, que describe unos procedimientos para la producción de un fibrinógeno, un complejo de protrombina, la antitrombina III y una solución de proteínas séricas estables en almacenamiento, se describe, entre otros detalles, una variante, en la que primeramente el complejo de protrombina (F II, F VII, F IX y F X) se obtiene por adsorción junto a intercambiadores de aniones y a continuación, a partir del material que ha pasado, se aísla todavía un fibrinógeno mediante adsorción con un ácido silícico coloidal. Puesto que en el caso de esta secuencia de purificación se llega sin embargo frecuentemente ya a una fibrinólisis, que repercute desventajosamente sobre la obtención del fibrinógeno, se prefiere la variante, en la que en primer lugar se separa el fibrinógeno mediante adsorción junto a ácido silícico, y a continuación se aísla el complejo de protrombina con ayuda de intercambiadores de aniones. En este caso, la utilización de un intercambiador de aniones repercute, por lo tanto, más bien desventajosamente sobre la calidad del fibrinógeno que se debe de obtener simultáneamente a partir del material que ha pasado.

En el documento WO 99/51724 se describe finalmente un procedimiento de cromatografía "negativa", para la purificación de unas proteínas heterólogas, entre otros productos también de un fibrinógeno, a partir de la leche de animales transgénicos. En este caso, sin embargo un hidroxil-apatito se utiliza como material en forma de gel, a fin de fijar a las proteínas de leche contaminantes.

También se describen unas especiales cromatografías negativas por afinidad, tales como, por ejemplo, una gelatina inmovilizada, que era capaz de empobrecer la fibronectina mediante una fijación específica (véase p.ej. la cita de Vuento & Vaheri, Biochem. J. (1979) 183, 331-337). La fibronectina es, sin embargo, una proteína estructural, que no tiene ninguna influencia sobre la estabilidad del fibrinógeno.

También se describe el hecho de que la lisina o unos compuestos análogos, son capaces de fijar muy específicamente a un plasminógeno y que esta capacidad se puede aprovechar para realizar la purificación de un plasminógeno por medio de una cromatografía por afinidad con Sepharose sustituida con L-lisina (Deutsch & Mertz, Science 170 (1970) 1.095-1.096; Matsuda y colaboradores, Thrombosis Research 1 (1972) 619-630). Esta capacidad de ciertos ligandos de lisina se aprovecha en algunos procedimientos para la purificación de un fibrinógeno como una etapa de procedimiento, con el fin de empobrecer al plasminógeno contaminante. A este respecto se ha de remitir p.ej. a los documentos WO 95/25748 o WO 93/05067. En este caso, se empobrece, sin embargo, de un modo muy específico solamente una proteína, el plasminógeno, ya que la lisina se fija muy específicamente a un determinado epítipo (dominios de Kringel) del plasminógeno.

En el documento WO 01/27623 se describe un procedimiento que establece cómo se pueden eliminar las isoaglutininas (anticuerpos de los grupos sanguíneos) a partir de la sangre o de unos componentes de la sangre tales como p.ej. un fibrinógeno. En este caso, se utilizan unos antígenos (p.ej. oligosacáridos) como ligandos de una columna de afinidad, que pueden fijar específicamente a las isoaglutininas. Una eliminación de las isoaglutininas es ventajosa para la evitación de complicaciones, que se presentan cuando los grupos sanguíneos de la sangre del donante o de los componentes de la sangre del donante se diferencian del grupo sanguíneo del receptor. Las isoaglutininas no tienen ninguna influencia sobre la estabilidad del fibrinógeno frente a una proteólisis.

También encuentran uso los documentos EP 0 366 946 o respectivamente US 5.094.960, que describen un procedimiento para la eliminación de agentes químicos del procedimiento que son solubles en lípidos, a partir de un material biológico, tal como, por ejemplo, un plasma, un material crioprecipitado, unos factores de la coagulación y un fibrinógeno. En este caso, se utiliza una columna de cromatografía hidrófoba, que en las condiciones escogidas adsorbe ciertamente a los agentes químicos del procedimiento, pero no a las proteínas del material biológico. En este procedimiento se trata solamente de la eliminación de sustancias químicas, que habían sido añadidas p.ej. para la desactivación de unos virus. Unas proteínas, tales como, por ejemplo, unos factores de la coagulación, a los que pertenecen, entre otros, también unos factores que descomponen al fibrinógeno, tales como el factor XI (F XI) (Scott y colaboradores, Arch Biochem Biophys 249 (1986) 480-488), no se deben de fijar en las condiciones escogidas y no se deben de empobrecer en esta patente. De un modo similar, en el documento DE 29 03 131 solamente deben de ser reemplazados ciertos iones mediante la utilización de un material intercambiador de iones. En esta patente se describe un procedimiento para la purificación simultánea de cuatro productos (una globulina A antihemofílica, un complejo de protrombina, una solución de proteínas séricas estables en almacenamiento, y un fibrinógeno), necesitando como material de partida un plasma, a partir del que se habían eliminado los iones de calcio o respectivamente, en el caso de la utilización de un plasma al citrato, se habían eliminado adicionalmente los iones de citrato. Los intercambiadores de cationes reemplazan en este caso a los iones de calcio por iones de sodio o de hidrógeno, y los intercambiadores de aniones reemplazan a los iones de citrato por iones de cloruro o de hidróxido. A partir del plasma que contiene un intercambiador de iones, que se ha obtenido de esta manera, se puede aislar entonces, entre otros, un fibrinógeno mediante adsorción junto a un ácido silícico. El intercambiador de cationes utilizado en este caso sirve sin embargo solamente para realizar un intercambio de los iones de calcio con el fin de evitar el comienzo de una reacción de coagulación, pero por medio de esta etapa no se efectúa ninguna purificación.

Las adsorciones se emplean igualmente en el caso de la purificación de proteínas plasmáticas. Así, en el documento DE 29 03 131 se aprovecha una adsorción con fosfato de tricalcio (TCP) para la purificación de un complejo de protrombina. En el documento WO 95/25748, ésta se emplea para la eliminación de un complejo de protrombina como una etapa de procedimiento destinada a la purificación de un fibrinógeno. También se deberían mencionar la adsorción mediando utilización de hidróxido de aluminio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ), que fija a factores del complejo de protrombina, y que puede desempeñar un cierto cometido también en el caso de la eliminación de lípidos. El  $\text{Al}(\text{OH})_3$  encuentra utilización, por ejemplo, en los documentos EP 0 383 234 o WO 01/48016. En este contexto, se habría de mencionar también una posible utilización del sulfato de bario ( $\text{BaSO}_4$ ).

5  
10  
15  
20  
Todos los procedimientos descritos para realizar la cromatografía/adsorción negativas, con la excepción de los documentos EP 0 366 946 y respectivamente US 5.094.960, en los que sólo se eliminan los agentes químicos del procedimiento, así como del documento DE 29 03 131, en el que sólo se eliminan los iones de calcio y citrato, tienen en común el hecho de que se utilizan otros materiales en forma de geles distintos de los que se describen para la(s) etapa(s) del procedimiento de acuerdo con el invento. A esto se agrega el hecho de que la ventaja especial de la etapa de procedimiento conforme al invento reside en que, mediante un eficiente empobrecimiento de una o varias proteínas contaminantes, en particular de unas proteínas que descomponen al fibrinógeno, o sus compuestos precursores, se puede obtener una formulación de fibrinógeno, cuya estabilidad en solución se ha aumentado significativamente. Para la obtención a escala técnica presenta un interés especial el hecho de desarrollar un procedimiento de purificación, que no sólo sea realizable de un modo rentable bajo puntos de vista de gran escala técnica, sino que también conduzca a un fibrinógeno, que permanezca amplísimamente estable en solución en el caso de un más largo almacenamiento.

25  
30  
35  
40  
En el caso de un fibrinógeno se trata de una proteína muy grande con una estructura complicada. Se trata de una glicoproteína de aproximadamente 340 kDa, que se compone de dos mitades simétricas. En cada caso dos cadenas alfa ( $\text{A}\alpha$ ), beta ( $\text{B}\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ) forman una estructura molecular alargada (de aproximadamente 47 nm), que forma tres dominios (un dominio central E y dos dominios D idénticos). Esta complicada estructura es imprescindible para la formación eficiente de una matriz estable de fibrina. En particular, la cadena alfa es afectada por una descomposición proteolítica incipiente por medio de proteasas que descomponen al fibrinógeno. Tales daños en la cadena alfa dan lugar, después de una acción de trombina, a un comienzo retardado de la coagulación y permiten sacar la conclusión de que una proteólisis de la(s) cadena(s) alfa puede influir sobre la polimerización de fibrina. También la estructura tridimensional del coágulo de fibrina es influida por una cadena alfa dañada. Se llega a una red más fina de fibrina con unas fibrillas más delgadas y una estabilidad mecánica más pequeña. Los extremos terminales de C de las cadenas alfa contienen unas secuencias de aminoácidos, junto a las cuales se constituyen unas uniones entre moléculas contiguas de fibrina, catalizadas por un F XIII activado. Unas reticulaciones ausentes disminuyen la estabilidad de la matriz de fibrina. Todo esto pone de manifiesto que un fibrinógeno con unas cadenas alfa fuertemente dañadas presenta una calidad disminuida, y no es deseable en el empleo farmacéutico p.ej. en el caso de pegamentos de fibrina. Algo comparable es válido también para la descomposición proteolítica de las otras cadenas de fibrinógeno, que por regla general se efectúa, sin embargo, con una cinética más lenta. La ventaja de las etapas de procedimiento de acuerdo con el invento se encuentra en el empobrecimiento de proteínas que descomponen al fibrinógeno, con el resultado de una estabilidad aumentada del fibrinógeno en una solución acuosa.

45  
50  
55  
60  
Unos procedimientos, que dan lugar a una eliminación lo más amplia que sea posible de las proteínas que descomponen al fibrinógeno, o respectivamente de sus proenzimas, son por lo tanto especialmente ventajosos, puesto que la estabilidad y la eficiencia de la solución obtenida de un fibrinógeno, también son mejoradas decisivamente en el caso de un más largo almacenamiento en una forma líquida. Una conservación en una forma líquida presenta una ventaja especial para un fibrinógeno, puesto que resulta factible la inmediata posibilidad de empleo de la sustancia activa en el paciente y por consiguiente no se necesitan la dedicación de tiempo para la reconstitución de las formulaciones liofilizadas y respectivamente la descongelación y el calentamiento de las formulaciones congeladas. Sin embargo, también en el caso de un almacenamiento como un material liofilizado o en el estado congelado es ventajoso el hecho de que la formulación de fibrinógeno reconstituida o respectivamente descongelada, sea estable todavía durante un período de tiempo más largo. Esto se pone de manifiesto, por ejemplo, en unas situaciones en donde, p.ej. para operaciones quirúrgicas, se había reconstituido de un modo preventivo un material, pero entonces su empleo no se había hecho necesario en virtud de consideraciones médicas. Este material, en el caso de tener estabilidad solamente a corto plazo, se debe de desechar y ya no podría pasar a emplearse en un momento posterior. En el caso de una utilización de pegamentos de fibrina es ventajoso en particular el hecho de que un fibrinógeno se presente en una forma líquida. En el caso de los pegamentos obtenibles comercialmente se trata en la mayoría de los casos de dos componentes. Uno de los componentes comprende un fibrinógeno, frecuentemente en común con un factor XIII y un agente inhibidor de la fibrinólisis tal como aptrotina, y el otro componente comprende trombina, frecuentemente en común con iones de calcio. Una reconstitución, con el fin de hacer que el pegamento esté presto para el empleo, requiere relativamente mucho tiempo, toda vez que el fibrinógeno se presenta en altas concentraciones.

65  
Otra gran ventaja adicional del fibrinógeno, que se había obtenido según el procedimiento conforme al invento, es la posibilidad de un almacenamiento en el estado líquido durante un determinado período de tiempo también a la temperatura ambiente, con lo cual se pueden mejorar p.ej. las propiedades de uso en situaciones de emergencia. También en los casos de unos largos caminos de expedición, en los que unas muy bajas temperaturas

eventualmente no se pueden garantizar constantemente, es ventajoso el hecho de que la estabilidad se pueda garantizar también a la temperatura ambiente durante esta fase. Un almacenamiento estable de un fibrinógeno en una solución facilita por lo tanto desde muchos puntos de vista la producción, el uso, el transporte y la administración al paciente. Debido a la estabilidad ventajosamente aumentada del fibrinógeno, que se produce según el procedimiento conforme al invento, en muchas formulaciones farmacéuticas es posible además prescindir de la adición de agentes inhibidores de la fibrinólisis o de la fibrinogenólisis, que en determinadas circunstancias pueden dar lugar a unos efectos secundarios indeseados o que se deben de evitar para la reducción de riesgos potenciales.

Resumiendo, a pesar de la existencia de los numerosos métodos de purificación que se han descrito, sigue subsistiendo una necesidad de unos métodos mejorados, que hagan posible una producción rentable a gran escala técnica de unas soluciones estables de fibrinógeno.

El presente invento está basado, por lo tanto, en la misión de indicar un procedimiento para la purificación de un fibrinógeno, que ponga a disposición un fibrinógeno con una alta estabilidad junto con un buen rendimiento. Sorprendentemente, se encontraron unos procedimientos de purificación, que se pueden llevar a cabo rentablemente también a gran escala técnica y que conducen a un fibrinógeno, cuya estabilidad en solución se ha aumentado significativamente.

Por lo tanto, es un objeto del invento un procedimiento para la purificación de un fibrinógeno, que **está caracterizado porque** contiene una o varias etapas de procedimiento, en las que se empobrece(n) una o varias proteínas contaminantes mediante una(s) cromatografía(s) negativa(s) y/o una(s) adsorción (adsorciones) negativa(s) mediando utilización de un gel de un colorante.

Los diversos geles de colorantes propuestos en este invento, que llevan diferentes ligandos para colorantes, están en situación de empobrecer a diferentes proteínas, lo que hace posible la producción de una solución que contiene fibrinógeno con una alta estabilidad del fibrinógeno.

La utilización de sales inorgánicas, difícilmente solubles, tales como TCP, Ba(SO<sub>4</sub>) y Al(OH)<sub>3</sub> no conduce, sin embargo, a ninguna formulación de fibrinógeno conforme al invento. No obstante, los materiales en forma de geles conformes al invento se pueden emplear también en combinación con sales inorgánicas, difícilmente solubles, tales como TCP, Ba(SO<sub>4</sub>) y Al(OH)<sub>3</sub>.

Como una medida de la estabilidad de un fibrinógeno se considera la proporción de fragmentos de bajo peso molecular de la descomposición del fibrinógeno en el caso de un almacenamiento a 30°C. Estos fragmentos de descomposición son determinados mediante una cromatografía con exclusión de tamaños como unos picos con un peso molecular más pequeño que el pico principal del fibrinógeno (pico 4 o ≤ pico 4). Una formulación de fibrinógeno se considera como estable en el sentido del invento cuando la proporción absoluta de fragmentos de descomposición de fibrinógeno (pico 4 o ≤ pico 4), en el caso de un almacenamiento a 30°C después de un mes en el estado líquido, se sitúa por debajo de 3 %, de manera preferida por debajo de 2,5 %.

Una purificación en el sentido del presente invento puede ser un procedimiento de purificación por cromatografía o un procedimiento de adsorción por tandas (discontinuo).

Se han acreditado unos procedimientos, en los que primeramente, por medio de una o varias etapas de precipitación, se produce una formulación de fibrinógeno con una pureza de por lo menos 50 % (p/p = peso/peso), de manera preferida de por lo menos 70 % (p/p), que se purifica luego adicionalmente mediante una(s) cromatografía(s) negativa(s) y/o una(s) adsorción (adsorciones) negativa(s) mediando utilización de un gel de un colorante y eventualmente por medio de unos procesos adicionales, que se han descrito.

Los procedimientos de acuerdo con el estado de la técnica se diferencian fundamentalmente por la etapa de procedimiento conforme al invento de la cromatografía negativa o de la adsorción negativa, en la que las condiciones se escogen de tal manera que un fibrinógeno no es fijado o sólo es fijado en una más pequeña proporción, y por consiguiente, al realizarse una separación por cromatografía, pasa a través de la columna. La cantidad predominante de fibrinógeno se encuentra por lo tanto en el material que ha pasado, o respectivamente, en el caso de la adsorción, en el material sobrenadante. La ventaja de la etapa de procedimiento conforme al invento se encuentra, entre otros detalles, en que se pueden escoger unas condiciones, que no perjudican a la estructura ni a la funcionalidad del fibrinógeno, y además de esto conducen a unos altos rendimientos. Puesto que en el caso de la etapa de procedimiento conforme al invento, en particular después de una purificación precedente mediante unas precipitaciones, esencialmente se tienen que fijar y separar solamente componentes secundarios, de modo condicionado por unas pequeñas dimensiones de la columna y por un sencillo equipamiento técnico, es posible una realización barata a gran escala técnica. En contraposición a esto, las cromatografías/adsorciones que se habían descrito hasta ahora, con una fijación del fibrinógeno, implican algunas desventajas. Puesto que el fibrinógeno es fijado, se requieren unas grandes dimensiones de las columnas, que, debido a las grandes cantidades de material en forma de gel y debido al equipamiento técnico más complejo, condicionan un procedimiento más caro. Para la producción a gran escala técnica, las eluciones mediante, por ejemplo, unos gradientes de sales, constituyen también un cuello de botella. Parcialmente, se tienen que emplear también unas rudas condiciones químicas, que

- 5 pueden perjudicar a la funcionalidad del fibrinógeno, con el fin de eluir de nuevo al fibrinógeno fijado. En parte, las purificaciones descritas están vinculadas también con altas pérdidas de fibrinógeno o sino no se pueden emplear rentablemente para las purificaciones a gran escala técnica de un fibrinógeno p.ej. debido a los materiales en forma de gel, que son más caros o no se pueden obtener comercialmente. Es objeto del invento un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1.
- Las siguientes formas de realización se han acreditado como ventajosas:
- 10 Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que como gel de un colorante se utiliza un gel de un colorante de color azul.
- Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que como gel de un colorante se utiliza un gel de un colorante de color rojo o verde.
- 15 Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que en el caso del gel de un colorante se trata de Blue Hyper D, Mimetic Blue Agarose, Mimetic Blue SA P6XL, Mimetic Blue 1 P6XL, Blue Trisacryl Plus LS, Blue Uniflow, Blue Sepharose 6FF, Blue Sepharose CL 6B, Red Sepharose CL 6B, Fractogel TSK AF Green y/o Matrex gel Green A.
- 20 Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que durante la etapa de procedimiento con una cromatografía negativa y/o una adsorción negativa se utiliza un valor del pH situado entre 6 y 9.
- Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que la etapa de procedimiento con una cromatografía negativa y/o adsorción negativa se lleva a cabo a una temperatura de 0-30°C.
- 25 Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que el rendimiento de fibrinógeno en el material que ha pasado de la cromatografía negativa, o en el material sobrenadante de la adsorción negativa es  $\geq 50\%$ , de manera preferida  $\geq 70\%$ .
- 30 Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que la etapa de procedimiento, que implica la adsorción o cromatografía negativa, se lleva a cabo en presencia de unas sustancias, que debilitan la fijación del plasminógeno a un fibrinógeno.
- Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que como material de partida se utiliza una mezcla obtenida a partir de sangre, de leche de animales transgénicos o de un material sobrenadante de la fermentación o de una fracción producida a partir de éste.
- 35 Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que como material de partida se utiliza un plasma humano, una fracción de plasma o un material crioprecipitado.
- 40 Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que una o varias etapas de procedimiento comprenden un tratamiento con hidróxido de aluminio.
- Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que están contenidas una o varias etapas de procedimiento, en las que se precipita un fibrinógeno.
- 45 Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que están contenidas una o varias precipitaciones con glicina o con otros aminoácidos.
- 50 Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que están contenidas una o varias etapas de procedimiento, en las que se elimina un plasminógeno a través de un material en forma de gel con lisina o con compuestos análogos a lisina como grupo funcional.
- Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que están contenidas una o varias etapas de procedimiento para el empobrecimiento y/o la desactivación de partículas infecciosas.
- 55 Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, tratándose en el caso de una etapa de procedimiento de una pasteurización y/o de una irradiación con rayos UV y/o de una nanofiltración.
- 60 Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que están contenidas una o varias ultrafiltraciones y/o diálisis.
- Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que se utilizan unos materiales de filtro con un límite de los pesos moleculares (en inglés "cut off" = límite de corte) de 100 a 500 kDa.
- 65

Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que están contenidas una o varias filtraciones en condiciones estériles.

5 Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que se combinan las siguientes etapas de procedimiento: producción de una fracción de plasma, una adsorción junto a hidróxido de aluminio, una desactivación de partículas infecciosas tales como, por ejemplo, virus, una precipitación, otras etapas adicionales de purificación y/o desactivación, una cromatografía negativa y/o una adsorción negativa, una ultrafiltración y una filtración en condiciones estériles.

10 Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que en el caso de la etapa de purificación adicional se trata de una etapa de procedimiento para la separación del plasminógeno.

15 Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que se modifican el orden de sucesión y/o el número de las etapas individuales del procedimiento.

Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, en el que se utiliza una de las etapas de procedimiento de acuerdo con el invento, y las proteínas plasmáticas que se han de separar, después de la realización de la cromatografía negativa y/o de la adsorción negativa, se eluyen desde el gel de un colorante.

20 Un procedimiento, como el que se ha descrito precedentemente, destinado al aislamiento de F XII, plasminógeno, t-PA y/o F XI.

25 Otras formas adicionales de realización se refieren al objeto de las reivindicaciones, y otras características y ventajas adicionales del invento se desprenden de la descripción de las formas preferidas de realización, de los Ejemplos y de las Figuras.

Sigue una breve descripción de las figuras:

30 Las Figuras 1 muestran la investigación de unas soluciones que contienen fibrinógeno, en cuanto a fragmentos de descomposición de fibrinógeno mediante una SEC-HPLC. Se muestra, que, mediante la utilización de una cromatografía de interacción hidrófoba negativa, la proporción de fragmentos de descomposición de fibrinógeno, en el caso de un almacenamiento durante dos meses a 30°C, se puede reducir significativamente y que, por consiguiente, se aumenta la estabilidad de un fibrinógeno en una solución.

35 La Figura 1a: Muestra una solución que contiene fibrinógeno, que adicionalmente se había purificado por medio de una cromatografía de interacción hidrófoba en la modalidad de cromatografía negativa, antes del comienzo del almacenamiento.

40 La Figura 1b: Muestra una solución que contiene fibrinógeno, que se había purificado adicionalmente por medio de una cromatografía de interacción hidrófoba en la modalidad de cromatografía negativa, después de un almacenamiento durante 2 meses a 30°C.

45 La Figura 1c: Muestra una solución de partida que contiene fibrinógeno, sin ninguna purificación adicional por medio de una cromatografía de interacción hidrófoba, después de un almacenamiento a 30°C durante 2 meses.

50 Por el concepto de fibrinógeno se debe de entender de manera preferida un fibrinógeno humano, que p.ej. se puede purificar a partir de una mezcla que contiene fibrinógeno, obtenida a partir de una sangre humana. Por el concepto de "mezcla obtenida a partir de sangre" se deben de entender, por ejemplo, una sangre entera, un plasma sanguíneo, fracciones de plasma o precipitados de plasma. Se prefiere en particular un fibrinógeno procedente de un plasma humano, de un material crioprecipitado o de la fracción 1 de Cohn. Un fibrinógeno se puede aislar tanto a partir de donaciones agrupadas de plasma así como también de donaciones individuales. Un fibrinógeno humano se puede obtener también a partir de la leche de animales transgénicos, véase, por ejemplo, el documento US 5.639.940. También está abarcado un fibrinógeno, que se obtiene mediante expresión recombinante a partir de un cultivo de células, véase, por ejemplo, el documento US 6.037.457. Así, es posible aislar un fibrinógeno a partir de los correspondientes materiales sobrenadantes de fermentación o de unas fracciones producidas a partir de ellos. No obstante, también está abarcado un fibrinógeno que se ha aislado a partir de una mezcla que contiene fibrinógeno, obtenida de una sangre de animal, de manera preferida de animales tales como mamíferos (p.ej. un/una cerdo, caballo, res bovina, cabra, oveja y perro).

60 Por el concepto de proteínas contaminantes, en el sentido del invento se deben de entender fundamentalmente todas las proteínas, que se presentan en el plasma junto a un fibrinógeno o en la leche de animales transgénicos o en el material sobrenadante de cultivos de células. De manera especialmente preferida, se trata de unas proteínas que descomponen a un fibrinógeno, que pueden descomponer proteolíticamente a un fibrinógeno, o de unos compuestos precursores de las proteínas que descomponen a un fibrinógeno (proenzimas), que se deben de activar

previamente para realizar una descomposición proteolítica de un fibrinógeno, o de unos agentes activadores de proteasas que descomponen a un fibrinógeno. En el caso de un proceso proteolítico, resultan unos fragmentos de descomposición de un fibrinógeno, que son más pequeños que el fibrinógeno y que pueden ser de bajo peso molecular. En este caso, las cadenas alfa y/o beta y/o gamma de un fibrinógeno pueden ser afectadas por la descomposición proteolítica. Unas posibles proteínas que descomponen a un fibrinógeno, o que apoyan su descomposición, o sus compuestos precursores, que se pueden presentar como posibles contaminantes en el caso de la purificación de un fibrinógeno procedente de un plasma, son, por ejemplo, plasmina, el F XIa, calicreína, la proteasa activadora del factor VII (FSAP), el F XIIa, los agentes activadores del plasminógeno tales como t-PA y u-PA, trombina, metaloproteasas (MMP's) o respectivamente unos correspondientes precursores tales como p.ej. un plasminógeno, el F XI, precalicreína, el sc-FSAP (monocatenario), el F XII, agentes activadores del plasminógeno de una sola cadena tales como sct-PA y scu-PA, protrombina y las pro-MMP's. En lo sucesivo ya no se diferenciará más entre las formas activadas y los respectivos compuestos precursores, sino que se utilizará la denominación de las proenzimas no activadas de un modo representativo para ambas formas.

El procedimiento conforme al invento hace posible mediante la(s) etapa(s) de procedimiento conforme(s) al invento de manera preferida un empobrecimiento de proteasas que descomponen al fibrinógeno, o de sus proenzimas y agentes activadores. Éstas/os pueden ser p.ej. plasminógeno, el F XI, precalicreína, el F XII, pro-MMP's y/o los agentes activadores de plasminógeno sct-PA y scu-PA. El factor de empobrecimiento (FE) se sitúa por encima de 1, de manera preferida por encima de 2. En este caso, la proporción del F XII se puede minimizar de manera particularmente preferida a  $\leq 20$  ng por  $DO_{280-320}$ . La proporción del F XI se puede minimizar a  $\leq 1$  ng por  $DO_{280-320}$ , de manera particularmente preferida a  $\leq 0,2$  ng por  $DO_{280-320}$ . La proporción del plasminógeno se puede disminuir de manera especialmente preferida hasta unos valores de  $\leq 5$  ng por  $DO_{280-320}$ . De manera especialmente preferida, mediante la etapa de procedimiento conforme al invento se aumenta la estabilidad de un fibrinógeno en una solución y en particular la estabilidad proteolítica de las cadenas del fibrinógeno. Los fragmentos de descomposición, que resultan mediante la proteólisis de un fibrinógeno por proteínas que descomponen al fibrinógeno, se pueden detectar por medio de diversos métodos. A modo de ejemplo, se mencionarán en este contexto la separación en presencia de geles de SDS-poliacrilamida en condiciones reductoras o no reductoras, unos métodos de HPLC (acrónimo del inglés "High Performance Liquid Chromatography" = cromatografía en fase líquida de alto rendimiento) tales como, por ejemplo, una SEC (acrónimo del inglés "Size Exclusion Chromatography" = cromatografía por exclusión de tamaños)-HPLC o métodos inmunológicos. La actividad del fibrinógeno remanente se puede determinar además según métodos habituales tales como los que se describen en la cita bibliográfica de Clauss (Acta-Haematol. 17 (1957) 237-246). La detección del empobrecimiento de proteínas que descomponen a un fibrinógeno, se puede efectuar por ejemplo de un modo específico con ayuda de anticuerpos, tales como p.ej. en el conocido ELISA (acrónimo del inglés "enzyme-linked immunosorbent assay" = ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas) o RIA (acrónimo del inglés "radioimmunosay" = ensayo radioinmunológico). En el caso de los anticuerpos se trata p.ej. de unos anticuerpos, que están dirigidos, entre otras, contra las mencionadas proteasas o contra otras proteasas conocidas, que descomponen al fibrinógeno. La detección del empobrecimiento se puede efectuar, no obstante, también de un modo inespecífico, mediante el recurso de que la solución de fibrinógeno se almacena en el estado líquido y se determina el grado de una eventual reacción de descomposición, después de un almacenamiento, en comparación con un testigo no empobrecido, que se ha almacenado asimismo.

Por el concepto de cromatografía en el sentido de este invento se debe de entender un método de separación, en el que una solución que contiene un fibrinógeno se conduce con ayuda de una corriente de líquido a través de una fase estacionaria, y se separan ciertos componentes de la mezcla. En el caso de la fase estacionaria se trata de manera preferida del material de relleno de una columna cromatográfica. El material de relleno, en lo sucesivo llamado también material en forma de gel, se compone de un material de soporte sólido de manera preferida a base de partículas porosas o no porosas, que tienen aproximadamente el mismo tamaño, junto al que se encuentran unos grupos funcionales unidos por enlaces covalentes, que establecen la modalidad de separación. En el caso del material de soporte se puede tratar, por ejemplo, de unos biopolímeros tales como una agarosa, una celulosa y un dextrano (de manera preferida Sepharose y Sephadex), o de unos polímeros sintéticos tales como p.ej. metacrilatos, un poli(vinil-benceno), un poliestireno, una poli(acrilamida), o de unos polímeros inorgánicos, tales como p.ej. un ácido silícico o esferitas porosas de vidrio. La solución, en la que está disuelto el fibrinógeno que se debe de purificar, con proteínas contaminantes, así como unos posibles tampones de lavado y tampones de equilibración, se han de considerar como fases móviles. Por el concepto de una cromatografía negativa en el sentido de este invento se ha de entender, que la fase estacionaria y la fase móvil se han de escoger de tal manera que, por una parte, un fibrinógeno pase a tomar parte en unas interacciones lo más débiles que sean posibles o no pase a tomar parte en ninguna interacción con la fase estacionaria, mientras que, por otra parte, una o varias proteínas contaminantes pasen a tomar parte en unas interacciones con la fase estacionaria que sean más fuertes que con un fibrinógeno. El fibrinógeno pasa por consiguiente predominantemente a través de la columna y se encuentra predominantemente en el material que ha pasado ( $> 50$  %), mientras que una o varias proteínas contaminantes se presentan de manera predominante fijadas a la fase estacionaria. La columna es tratada previamente y equilibrada antes de la carga con la solución que contiene un fibrinógeno, correspondiendo a los requisitos del material en forma de gel. El tampón de equilibración corresponde de manera preferida a la solución, en la que están disueltos el fibrinógeno y las proteínas contaminantes. Con el fin de minimizar las pérdidas de fibrinógeno, en la fase móvil de la columna se puede eliminar por lavado el fibrinógeno que ha quedado todavía en ella, correspondiendo el volumen del tampón de lavado de manera preferida aproximadamente al volumen de la columna. El tampón de lavado corresponde de manera

preferida a la solución, en la que están disueltos el fibrinógeno y las proteínas contaminantes. El tampón de lavado se puede reunir eventualmente con el material que ha pasado. Las proteínas contaminantes, que están fijadas a la fase estacionaria, se pueden eluir con unas soluciones correspondientes y, por motivos de ahorro de costes, la fase estacionaria, mediante una regeneración, se puede utilizar eventualmente múltiples veces para una etapa de purificación por cromatografía negativa. Si no es posible realizar una regeneración, o si ésta no es rentable, se desecha el material en forma de gel consumido. No obstante, las proteínas eluidas desde la fase estacionaria, se pueden aprovechar, en caso necesario, también como un material de partida para el aislamiento de estos componentes proteínicos. Mediante otras etapas de purificación o respectivamente de procedimiento eventualmente adicionales, se pueden obtener unos concentrados de proteínas. De esta manera se pueden producir p.ej. unos concentrados de un plasminógeno, del F XII o del F XI, entre otros.

En el caso de la cromatografía negativa, en el sentido de este invento, para la fase estacionaria se puede utilizar fundamentalmente cualquier material que, en las condiciones escogidas, en particular la elección de la fase móvil, esté en situación de entrar a tomar parte en unas interacciones más fuertes con una o varias proteínas contaminantes que con el fibrinógeno. Para la etapa de procedimiento conforme al invento están abarcados unos materiales en forma de gel (fases estacionarias), que se cuentan entre los conjuntos formados de los intercambiadores de cationes, los geles hidrófobos o los geles de colorantes. Existe una amplia oferta de materiales de columna obtenibles comercialmente, o de columnas terminadas de empaquetar, p.ej. de las entidades Amersham, Bio-Rad, Biosepra, Merck, Perseptive Biosystems, Pharmacia, Prometic, Toso Haas, que se han de considerar como abarcadas. Algunas de ellas se ensayaron a modo de ejemplo dentro de los Ejemplos expuestos. Las fases móviles se han de adaptar a los respectivos materiales en forma de gel. De acuerdo con el invento los valores del pH están situados en el intervalo comprendido entre 5,5 y 9. Correspondientemente, se han de escoger unos sistemas de tampones, que tamponen bien este intervalo. Ejemplos de ellos son los tampones de citrato, de fosfato y Tris.

La etapa de procedimiento de la cromatografía negativa se lleva a cabo de manera preferida a una temperatura comprendida entre 2 y 30°C.

Los intercambiadores de cationes son unos materiales en forma de geles de la cromatografía por intercambio de iones, en los que las proteínas compiten con iones de sales de la fase móvil por las posiciones cargadas situadas sobre una fase estacionaria, la matriz intercambiadora de iones. Los intercambiadores de cationes contienen unos grupos cargados negativamente y pueden interactuar por lo tanto con unos grupos cargados positivamente de proteínas. La interacción es dependiente de la fuerza de la carga positiva y de la densidad de carga sobre la superficie del intercambiador de cationes así como de la proteína. Las proteínas llevan cargas positivas o negativas debido a los grupos laterales de carácter básico y ácido de determinados aminoácidos, siendo el estado global de cargas dependiente del valor del pH de la solución. Junto a la composición de aminoácidos, sin embargo, también unas modificaciones posteriores a la traducción (tales como por ejemplo unas fosforilaciones) contribuyen al punto isoelectrico (pI) de una proteína, en el que las cargas positivas y negativas se neutralizan. El fibrinógeno, con un pI de aproximadamente 5,1 - 5,5, pertenece a las proteínas de carácter más bien ácido. Unos intercambiadores de cationes preferidos contienen como función intercambiadora (grupos funcionales, ligandos) unos grupos sulfometilo (los tipos S), unos grupos sulfopropilo (los tipos SP) o unos grupos carboximetilo (los tipos CM). Entre el sector de los intercambiadores de cationes, en el sentido de este invento, se cuentan sin embargo, también aquéllos que tienen otros adecuados grupos funcionales cargados negativamente, tales como, por ejemplo, la heparina. Los intercambiadores de cationes han sido descritos por, y son obtenibles comercialmente de, unas entidades tales como, por ejemplo, Amersham, Bio-Rad, Biosepra, Merck, Perseptive Biosystems, Pharmacia, Prometic o Toso Haas. Unos intercambiadores de cationes preferidos son los geles sanitizables in situ tales como p.ej. Fractogel EMD SO<sub>3</sub> 650 (de Merck), Macro-Prep 50 S (de Bio-Rad), CM-Sepharose CL-6B (de Pharmacia), Fractogel TSK CM 650 (de Merck), Fractogel EMD CM, SP Sepharose, Heparin Fractogel (de Merck) o Heparin-Sepharose CL 6B (de Pharmacia).

La fase móvil en el caso del intercambiador de cationes se deberá escoger de tal manera que el fibrinógeno posea una carga negativa total en el caso del valor del pH escogido y/o que en el caso de la fuerza iónica escogida no se presente ninguna interacción o solamente unas pequeñas interacciones con los grupos cargados negativamente de la fase estacionaria, mientras que entre la fase estacionaria y una o varias proteínas contaminantes se presentan todavía unas interacciones. El valor del pH debería estar situado por encima del pH de 5,5 y en particular de manera preferida por encima de 6,0 y en hasta aproximadamente 9. Como sales se pueden utilizar las sales conocidas para un experto en la especialidad para intercambiadores de cationes, en particular se prefiere el NaCl. La concentración de sales se sitúa de manera preferida en el intervalo de 0 a 400 mM, de manera especialmente preferida en el intervalo de 0 a 100 mM.

Una cromatografía hidrófoba **está caracterizada porque** las regiones no polares de la superficie de una proteína entran en interacción con grupos funcionales (ligandos) hidrófobos de la fase estacionaria en el caso de unas concentraciones de sales, que son más altas en la mayoría de los casos. El gel hidrófobo como fase estacionaria es de manera preferida un polímero sintético, un silicato o un biopolímero tal como p.ej. Sepharose, cuyas superficies se han modificado por medio de ligandos hidrófobos como grupos funcionales. En el caso de los ligandos hidrófobos, se trata de manera preferida de grupos alquilo con 1 hasta más que 24 átomos de carbono (C), que

pueden ser lineales o ramificados, o de ligandos aromáticos. Por ejemplo, son posibles grupos de C1 (metilo), C3 (propilo), C4 (butilo), C5 (pentilo), C6 (hexilo) y C8 (octilo), se prefieren en particular los grupos propilo, butilo, pentilo, hexilo y octilo. Los grupos alquilo pueden estar derivatizados, tal como por ejemplo los grupos tiopropilo. De manera preferida, se pueden utilizar también grupos fenilo o unos compuestos aromáticos, que contienen un derivado de fenilo, tal como p.ej. grupos de fenil-alanina. Los grupos fenilo pueden estar unidos por ejemplo también con cadenas de alquilo. Se pueden utilizar, por ejemplo, también grupos piridilo o sus derivados. Los materiales hidrófobos son ampliamente conocidos para un experto en la especialidad y son obtenibles comercialmente, por ejemplo, en el caso de las entidades Amersham, Bio-Rad, Biosepra, Merck, Perseptive Biosystems, Pharmacia, Prometic y Toso Haas. Como fase estacionaria se prefieren en particular p.ej. Macro Prep Methyl HIC Support (de Bio-Rad), Fractogel EMD Propyl 650 (de Merck), Fractogel EMD Butyl 650 (de Merck), Fractogel TSK Butyl 650 (de Merck), Macro Prep i Butyl HIC Support (de Bio-Rad), Butyl Cellufine (de Amicon), Butyl Sepharose 4 Fast Flow (de Pharmacia), Butyl S-Sepharose 6 Fast Flow (prototipo de Pharmacia), HIC Fractogel Pentyl (de Merck), Hexyl S-Sepharose 6 Fast Flow (prototipo de Pharmacia), Octyl Sepharose CL 4B (de Pharmacia), Fractogel HW 65 Propyltentakel (de Merck), Fractogel HW 65 Butyltentakel (de Merck), Fractogel TA 650 (de Merck), Phenyl Sepharose High Performance (de Pharmacia), Phenyl Sepharose Fast Flow (de Pharmacia), Phenylalanin Sepharose (de Pharmacia), Thiopropyl Sepharose 6B (de Pharmacia) o Pyridyl S-Sepharose 6 Fast Flow (de Pharmacia).

La interacción hidrófoba de las proteínas con la fase estacionaria es influida no solamente por medio de los grupos funcionales (p.ej. una longitud de cadena creciente de los grupos alquilo aumenta el carácter hidrófobo), sino también muy fuertemente por la fuerza iónica y por el valor del pH de la solución, que forma la fase móvil. En dependencia de la fase estacionaria utilizada, la fase móvil se ha de escoger de tal manera que una o varias proteínas contaminantes pasen a tomar parte en interacciones hidrófobas con la fase estacionaria, mientras que un fibrinógeno pasa a través de la columna de manera preferida en más que un 50 %. Para un experto en la especialidad son conocidas unas posibles fases móviles y unas adaptaciones a la respectiva fase estacionaria. El valor del pH debería situarse de manera preferida en el intervalo situado por encima de aproximadamente 5 y hasta de aproximadamente 9. Se pueden utilizar unas sales conocidas para la cromatografía de interacción hidrófoba, se prefieren en particular p.ej. NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La concentración de las sales, en dependencia de la fase estacionaria, se sitúa de manera preferida en el intervalo de 0,01 a 2 M.

Una cromatografía por afinidad **está caracterizada porque** se llega a la adsorción reversible específica, de una proteína (o de un conjunto de proteínas) junto a un ligando individual, que está unido a la matriz de soporte. Una matriz de soporte adecuada es p.ej. Sepharose tal como Sepharose 4B o Sepharose CL, cuyos grupos OH se pueden aprovechar para la unión por enlaces covalentes del ligando. Otros soportes adecuados son unos polímeros conocidos tales como p.ej. Fractogel, Sephacryl, Cellufine, u otros similares. Unos posibles ligandos monoespecíficos son p.ej. unos anticuerpos, que están dirigidos contra proteínas que descomponen a un fibrinógeno, tales como p.ej. un plasminógeno, el F XI, precalicreína, u otros. Las columnas de afinidad con anticuerpos son empleables a gran escala técnica pero son caras y desde el punto de vista económico sólo son empleables eficazmente de un modo condicionado. Así, dentro del marco de este invento están abarcados unos colorantes como ligandos específicos de grupos, que fijan a una o varias proteínas contaminantes, en particular a unas proteínas que descomponen a un fibrinógeno. Se prefieren en particular unos geles de colorantes de colores azul, rojo y verde. Unos correspondientes materiales son p.ej. Blue Sepharose 6FF (de Pharmacia), Blue Sepharose CL 6B (de Pharmacia), Blue Trisacryl Plus LS (de Biosepra/Ciphergen), Blue Hyper D (de Biosepra/Ciphergen), Mimetic Blue Agarose (de Prometic), Mimetic Blue SA P6XL (de Prometic), Mimetic Blue 1 P6XL (de Prometic), Red Sepharose CL 6B (de Pharmacia), Fractogel TSK AF Green (de Merck) y/o Matrex gel Green A (de Amicon). Otros geles de colorantes son ampliamente conocidos para un experto en la especialidad y son obtenibles comercialmente de, o producibles por, los fabricantes pertinentes.

El valor del pH de la fase móvil se sitúa en el intervalo de 5,5 hasta 9.

Por el concepto de adsorción negativa, en el sentido de este invento se ha de entender que una solución que contiene un fibrinógeno se mezcla en un recipiente adecuado con un material de adsorción, que en las condiciones escogidas no adsorbe el fibrinógeno o sólo lo adsorbe en pequeñas cantidades, pero que, por el contrario, son adsorbidas una o varias proteínas contaminantes. Un fibrinógeno permanece, por consiguiente, predominantemente en la solución. Este procedimiento se conoce también como procedimiento discontinuo o por tandas. Las condiciones de la adsorción se deben de escoger de tal manera que las proteínas contaminantes tengan suficientemente tiempo y la posibilidad para / de fijarse al material de adsorción. Por ejemplo, una mezcladura se puede efectuar p.ej. mediante agitación cuidadosa a unas temperaturas adecuadas. Unas temperaturas adecuadas se sitúan, por ejemplo, entre 2 y 30°C. Como material de adsorción se puede emplear fundamentalmente cualquier material que, en las condiciones escogidas, esté en situación de fijar a una o varias proteínas contaminantes y no fijar al fibrinógeno o sólo fijarlo en pequeñas cantidades. Los materiales abarcados son unos materiales en forma de geles, que ya se habían expuesto al referirse a la cromatografía, y que se cuentan por consiguiente entre los conjuntos de los intercambiadores de cationes, de los geles de colorantes y de los geles hidrófobos. Unas soluciones preferidas corresponden a unas fases móviles preferidas en el caso de la cromatografía. El material de adsorción con las proteínas contaminantes fijadas, se puede separar con respecto de la solución que contiene un fibrinógeno mediante unos métodos conocidos para un experto en la especialidad. De manera preferida, se han de

mencionar en este contexto los métodos de la filtración, de la centrifugación y/o de la sedimentación. El material de adsorción se puede regenerar de manera preferida mediante una elución de los contaminantes y mediante un cambio de tampón, de tal manera que él se puede utilizar múltiples veces. Las proteínas eluidas desde el material de adsorción se pueden aprovechar en caso necesario también como una base de partida para el aislamiento de estos componentes proteínicos. Mediante eventualmente otras etapas de purificación o respectivamente de procedimiento se pueden obtener de este modo unos concentrados de proteínas. De esta manera se pueden producir p.ej. unos concentrados de plasminógeno, F XII y F XI, entre otros.

La adsorción negativa en el formato por tandas es una técnica, que se puede utilizar adicionalmente a, o en lugar de, la cromatografía negativa.

Las etapas de procedimiento de acuerdo con el invento hacen posible por regla general un rendimiento por etapa de  $\geq 50\%$ , de manera preferida de  $\geq 70\%$ , de fibrinógeno en el material que ha pasado o respectivamente en el material sobrenadante.

En otra forma de realización adicional, durante el procedimiento conforme al invento, y en particular durante las etapas de procedimiento de acuerdo con el invento, se añaden unas sustancias, que debilitan la fijación del plasminógeno a un fibrinógeno. Es sabido, que un fibrinógeno tiende a fijar a otras proteínas tales como, por ejemplo, el plasminógeno. Esto da lugar reiteradamente a una purificación concomitante parcial de contaminantes tales como el plasminógeno. Por medio de las sustancias que debilitan a la fijación, se pueden minimizar unas purificaciones concomitantes. Entre estas sustancias se cuentan de manera preferida unos  $\omega$ -aminoácidos tales como el ácido  $\epsilon$ -aminocaproico, además el ácido tranexámico, PAMBA (acrónimo del inglés "p-aminomethylbenzoic acid" = ácido para-aminometil-benzoico), lisina y otros compuestos análogos a la lisina.

Es conocido que el enriquecimiento y el aislamiento de un fibrinógeno requiere, por regla general, varias etapas de procedimiento y que hay numerosas posibilidades de combinación de estas etapas individuales de purificación. El procedimiento conforme al invento, junto a una (o varias) etapa(s) de procedimiento de acuerdo con el invento, puede contener por lo tanto unas etapas adicionales de procedimiento, que se pueden deducir fundamentalmente a partir del estado de la técnica para la purificación de un fibrinógeno y que están abarcadas por la presente. El estado de la técnica para la purificación de un fibrinógeno ya se ha expuesto en lo esencial y los documentos de patentes y correspondientemente las publicaciones citados/as están abarcados/as por la presente. Se prefieren unas etapas de procedimiento, que no contienen ninguna cromatografía o adsorción, en la que el fibrinógeno se fije en gran parte y que, por consiguiente, se hiciera necesaria una elución con todas sus desventajas.

En una forma preferida de realización, el procedimiento conforme al invento contiene una o varias etapas de procedimiento, en las que se añade hidróxido de aluminio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) a la solución que contiene fibrinógeno y que debe de ser purificada. El  $\text{Al}(\text{OH})_3$  adsorbe primordialmente a los factores del complejo de protrombina y se puede eliminar, por ejemplo, mediante una centrifugación y/o filtración.

En una forma preferida de realización, el procedimiento contiene una o varias etapas de procedimiento, en la(s) que se precipita el fibrinógeno. Se prefiere en particular la adición de glicina o de otros aminoácidos para realizar la precipitación. En el caso de una concentración suficientemente alta de glicina, esto conduce a una precipitación directa del fibrinógeno (precipitación con glicina en una sola etapa). Sin embargo, alternativa o adicionalmente es posible una precipitación con glicina en dos etapas, en la que la concentración de glicina en una primera etapa se escoge de tal manera que el fibrinógeno permanezca esencialmente en el material sobrenadante, y las proteínas precipitadas sean separadas p.ej. mediante centrifugación, y tan solo en una segunda etapa se precipita la cantidad principal del fibrinógeno mediante un aumento de la concentración de glicina, tal como se muestra también en los Ejemplos. Como se ha mencionado anteriormente, en lugar del aminoácido glicina se pueden utilizar también otros aminoácidos. A modo de ejemplo, se han de mencionar en este punto alanina, glutamina o ácido glutámico. No obstante, en este contexto se pueden utilizar también otros agentes conocidos de precipitación (tales como p.ej. cloruro de sodio, sulfato de amonio o un poli(etilenglicol)).

En otra forma preferida de realización, el procedimiento contiene una o varias etapas de procedimiento, en la(s) que el plasminógeno se empobrece por medio de un material en forma de gel con ligandos de lisina o con unos ligandos análogos. Ejemplos de ellos son en este caso Lysin-Sepharose, Lys-Hyper D, Lys-Fractogel, Aminohexyl-Sepharose, entre otros. Esto conduce a un empobrecimiento ventajoso de plasminógeno, que puede repercutir adicionalmente de manera ventajosa sobre la estabilidad de un fibrinógeno en el caso de un almacenamiento en el estado líquido. Además de esto, también es ventajoso un empobrecimiento de plasminógeno, cuando el concentrado de fibrinógeno se deba de emplear como un componente de un pegamento de fibrina.

En otra forma preferida de realización, el procedimiento incluye una o varias etapas de procedimiento, en la(s) que unas partículas infecciosas potencialmente presentes, tales como p.ej. unos virus, se desactivan o se empobrecen lo más ampliamente que sea posible. Si se aísla el fibrinógeno a partir de un plasma humano, esto constituye un componente especialmente preferido del procedimiento conforme al invento. La desactivación o el empobrecimiento de partículas infecciosas se pueden efectuar según unas técnicas conocidas para un experto en la especialidad, que están abarcadas por la presente. En este caso se trata de unos procedimientos tales como, por ejemplo, una

pasteurización, un calentamiento en el estado seco, una nanofiltración, unos aditivos químicos (por ejemplo, detergentes), irradiaciones, o unas combinaciones de éstos/as.

En otra forma preferida de realización, el procedimiento contiene una o varias etapas de procedimiento, que implica(n) una ultrafiltración y/o diálisis. Estos métodos se emplean ventajosamente con el fin de cambiar de tampón en la solución que contiene fibrinógeno, es decir de modificar a unos componentes de la solución o respectivamente concentrar incipientemente la solución proteínica. Esto es preferido en particular para la preparación previa para una etapa de purificación o al final del procedimiento conforme al invento, con el fin de escoger unos componentes de formulación, que sean adecuados para el almacenamiento y la utilización como una formulación farmacéutica.

La ultrafiltración ofrece también la posibilidad de empobrecer adicionalmente las proteínas contaminantes, siendo escogidos unos filtros, que dejan pasar a las proteínas contaminantes, pero retienen a un fibrinógeno, tal como se describe también, por ejemplo, en el documento WO 93/17776. Con arreglo a este invento, se pudo demostrar que en el caso de la elección de unos filtros adecuados con un límite de pesos moleculares (límite de corte) de p.ej. 300 kDa también es posible realizar un empobrecimiento de las proteínas que descomponen a un fibrinógeno. En una forma especialmente preferida de realización, para la ultrafiltración se emplean, por lo tanto, unos filtros con un límite de pesos moleculares (límite de corte) de 50 a 500 kDa.

En otra forma preferida de realización, el procedimiento contiene una filtración en condiciones estériles. Esto es conveniente en particular a la terminación del procedimiento para la producción de una formulación farmacéutica.

En una forma preferida de realización, varias de las etapas de procedimiento que se han expuesto antes, se combinan con una o varias etapas de procedimiento de acuerdo con el invento para establecer un procedimiento conforme al invento. El orden de sucesión de las etapas individuales de procedimiento se puede hacer variar en este caso. También pueden pasar a usarse múltiples veces unas etapas individuales de procedimiento, tales como p.ej. la precipitación. En una forma de realización particularmente preferida, una combinación contiene, junto a una o varias etapas de procedimiento de acuerdo con el invento, por lo menos las etapas de la adsorción junto a  $Al(OH)_3$ , unas precipitaciones con glicina en una y/o dos etapas, así como la pasteurización. De manera ventajosa, estas etapas de procedimiento se combinan con una columna de afinidad con ligandos de lisina. Después de haber finalizado la purificación, los componentes de la solución son reemplazados por una solución, que es apropiada para el almacenamiento. Unos métodos posibles, tales como, por ejemplo, una diálisis, una ultrafiltración, etc. son conocidos para un experto en la especialidad y están abarcados por la presente. A la purificación le puede seguir una filtración en condiciones estériles. El procedimiento de purificación conforme al invento se compone en una forma de realización especialmente preferida de las siguientes etapas de procedimiento:

- producción de una fracción de plasma
- adsorción junto a hidróxido de aluminio
- desactivación de partículas infecciosas tales como, por ejemplo, virus
- precipitación
- otras etapas adicionales de purificación y/o desactivación
- cromatografía(s) negativa(s) y/o adsorción (adsorciones) negativa(s)
- ultrafiltración/diafiltración
- filtración en condiciones estériles

En una forma de realización particularmente preferida, entre las otras etapas adicionales de purificación se cuenta una columna de afinidad con ligandos de lisina, tal como, por ejemplo, una con Lys-Sepharose. Se pueden hacer variar tanto el número como también el orden de sucesión de etapas individuales del procedimiento. Así, p.ej. se podrían efectuar una o varias adsorciones o etapas de cromatografía negativas inmediatamente a continuación de la adsorción junto a  $Al(OH)_3$ . Esto tendría la ventaja de que ya en un momento temprano se empobrecen unas posibles proteínas que descomponen al fibrinógeno que por consiguiente, en el transcurso ulterior de la purificación, ya no pueden influir negativamente sobre la estabilidad del fibrinógeno.

En el caso del uso de las formas especialmente preferidas de realización, se puede reducir significativamente la descomposición del fibrinógeno en el caso de un almacenamiento de un fibrinógeno en una forma líquida durante 1 mes a 30°C, en ausencia de agentes inhibidores de la fibrinólisis que se añadan, es decir que en este período de tiempo de almacenamiento se produce significativamente menos cantidad de fragmentos de descomposición de bajo peso molecular. Con un análisis mediante una SEC-HPLC se puede demostrar que el aumento de la proporción de fragmentos de descomposición de bajo peso molecular, en comparación con los picos restantes en el caso del uso de las formas especialmente preferidas de realización, que emplean adicionalmente una columna de afinidad con ligandos de lisina, se sitúa por debajo de 2,5 %, en particular por debajo de 1,5 %-2 %.

El fibrinógeno obtenido según el procedimiento conforme al invento o respectivamente una correspondiente formulación farmacéutica contiene de manera preferida solamente  $\leq 0,2$  ng por  $DO_{280-320}$  de F XI y/o  $\leq 20$  ng por  $DO_{280-320}$  de F XII y/o  $\leq 5$  ng por  $DO_{280-320}$  de plasminógeno y/o  $\leq 0,02$  ng, de manera preferida  $\leq 0,01$  ng por  $DO_{280-320}$  de t-PA.

Las proteínas contaminantes, que se han fijado durante la etapa de procedimiento conforme al invento para la purificación de un fibrinógeno por medio de una cromatografía o adsorción junto a columnas con colorantes, pueden servir como una base de partida para el aislamiento de estos componentes proteínicos. Mediante una elución de las proteínas desde el correspondiente material en forma de gel y eventualmente otras etapas adicionales de purificación o respectivamente de procedimiento se pueden obtener unos correspondientes concentrados de proteínas. De esta manera se pueden producir p.ej. unos concentrados de plasminógeno, t-PA, F XII o F XI. Por consiguiente, esta solicitud de patente abarca un procedimiento para el aislamiento de una o varias proteínas plasmáticas.

Además, el invento se debe de ilustrar mediante los siguientes Ejemplos, los cuales, sin embargo, no deben de tener un efecto restrictivo de ninguna de las maneras.

### Ejemplo 1

En este Ejemplo se muestra que ciertos materiales intercambiadores de cationes así como ciertos geles hidrófobos y geles de colorantes están en situación de purificar una solución que contiene un fibrinógeno mediante una cromatografía negativa, de tal manera que se aumente la estabilidad del fibrinógeno en comparación con la del material de partida.

Para la obtención de un material de partida de fibrinógeno se produjo un concentrado de fibrinógeno pasteurizado, tal como se describe en el documento EP 0 103 196, y se precipitó fraccionadamente mediante una adición de glicina.

El precipitado rico en fibrinógeno se disolvió primeramente en un disolvente acuoso adecuado (NaCl 50 mM; citrato de tri-sodio dihidrato 20 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 7,3) y sirvió como material de partida para las etapas posteriores de purificación mediante utilización de la cromatografía negativa.

Cada una de las columnas de cromatografía (con un diámetro Ø de 0,7 cm) utilizadas para esta purificación se cargó con 1,0 ml del respectivo material en forma de gel. Las columnas se equilibraron en uno de los tampones 1-3 en dependencia del respectivo material en forma de gel.

Tampón 1: NaCl 50 mM, fosfato de sodio 50 mM, de pH 7,4, para intercambiadores de cationes y para la columna comparativa

Tampón 2: NaCl 1.000 mM, fosfato de sodio 50 mM, de pH 6,5, para geles hidrófobos

Tampón 3: fosfato de sodio 50 mM, de pH 7,4, para geles de colorantes.

En cada caso 30-40 ml de una solución que contiene un fibrinógeno se dializaron frente al correspondiente tampón (véase la Tabla 1) y se diluyeron con los correspondientes tampones hasta llegar a una densidad óptica DO<sub>280-320</sub> de 10. Se aplicaron 15 ml de esta solución de fibrinógeno por cada columna y las columnas se lavaron en cada caso con 1,0 ml del respectivo tampón (1 - 3). El material que había pasado por la columna y la solución de lavado se reunieron. En primer lugar, se midió la densidad óptica en un fotómetro a 280 y 320 nm (DO<sub>280-320</sub>), con el fin de determinar el rendimiento (en %) en comparación con el material de partida. Una parte alícuota de este material se retuvo para el análisis para efectuar la determinación del valor 0 del subsiguiente ensayo de almacenamiento. Los materiales que pasaron por las columnas, reunidos con las respectivas soluciones de lavado y con el material de partida, se dializaron frente a un tampón que contenía NaCl 100 mM, citrato de Na<sub>3</sub> 20 mM, L-Arg al 5 %, de pH 7,2, y en cada caso 1 ml de éstos se mezcló con aziduro de sodio (concentración final 0,05 % p/v = peso/volumen). El almacenamiento de estas formulaciones de fibrinógeno, que habían sido purificadas de diferentes maneras, así como del material de partida como testigo, se efectuó a +30°C durante unos períodos de tiempo de almacenamiento hasta de 3 meses. La estabilidad del fibrinógeno se determinó después de los correspondientes períodos de tiempo de almacenamiento en cada caso mediante una SEC-HPLC. En este caso se trata de una cromatografía con exclusión de tamaños (SEC), que separa a las proteínas y a los productos de disociación que están presentes, de un modo correspondiente a su peso molecular. Los fragmentos de bajo peso molecular, que han resultado a causa de una descomposición proteolítica del fibrinógeno, se encuentran como un nuevo pico (pico de fragmento 4) así como eventualmente unos nuevos picos adicionales con un período de tiempo de retención aumentado. Se determinó el área de superficie de los picos de fragmentos ( $\leq$  pico 4) y se calculó como la proporción porcentual de todos los picos. El valor se corrigió en cuanto a la pequeña proporción que había antes del comienzo del almacenamiento (valor cero) y los valores determinados a partir de esto se muestran como resultados en la Tabla 1. Ellos reproducen el aumento de la cantidad de fragmentos de descomposición durante el almacenamiento en unas condiciones aceleradas.

Para la realización de la analítica se utilizó un correspondiente sistema de HPLC con una columna de SEC (TSK gel G 4000 SWXL, 7,5 x 300 mm de TOSO HAAS). La separación de las proteínas y de los fragmentos de proteínas después de unos correspondientes períodos de tiempo de almacenamiento, se efectuó con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min en un apropiado tampón de elución a 20-25°C. La detección de los picos de proteínas o respectivamente de fragmentos de proteínas se efectuó a 280 nm.

La Figura 1 muestra a modo de ejemplo unos típicos transcurros de la separación de un fibrinógeno mediante una SEC-HPLC. Ella muestra la separación de una solución que contiene fibrinógeno, que se había purificado con ayuda de una cromatografía con Lysin-Sepharose y de una HIC negativa, antes del comienzo del almacenamiento (t = 0, valor cero, Figura 1a), y después de un almacenamiento durante 2 meses a 30°C (t = 2 meses, Figura 1b).

- 5 Por el contrario, la Figura 1c muestra la separación de una solución que contiene fibrinógeno, sin ninguna purificación adicional, mediante una HIC negativa, después de un almacenamiento durante 2 meses a 30°C (t = 2 meses). El valor cero (t = 0) para esta solución que contiene fibrinógeno no se muestra, puesto que él muestra un resultado de la separación que es comparable con el de la Figura 1a.

10 El pico principal en el caso de un período de tiempo de retención de aproximadamente 15-16 min corresponde al fibrinógeno. En el caso del pico con un periodo de tiempo de retención de aproximadamente 24 min así como de los picos con unos periodos de tiempo de retención más altos se trata de los fragmentos de descomposición del fibrinógeno. A partir de la Figura 1b se puede deducir manifiestamente que mediante la utilización del gel hidrófobo, se ha reducido manifiestamente el área de superficie situada debajo de los picos que corresponden a los fragmentos de descomposición, después de un almacenamiento durante dos meses a 30°C, en comparación con el material testigo sin ninguna purificación por HIC, que se había almacenado asimismo durante 2 meses a 30°C (Figura 1c). La aparición en menor cantidad de los fragmentos de descomposición se debe de valorar como una demostración de la más alta estabilidad del fibrinógeno después de una purificación mediante una HIC negativa.

Tabla 1

Material en forma de gel	Tampón	Rendimiento (%)	Aumento de la cantidad de los fragmentos de descomposición (% de todos los picos)	
			$\Delta$ ( $\leq$ pico 4) después de 2 meses	$\delta$ ( $\leq$ pico 4) después de 3 meses
<b>Intercambiador de cationes</b>				
Fractogel EMD SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 650	1	78	4,1	6,0
Heparin Fractogel	1	91	4,2	6,4
<b>Gel hidrófobo</b>				
Fractogel TA 650	2	81	4,3	5,8
Butyl Cellufine	2	73	3,9	6,4
Fractogel EMD Butyl 650	2	82	4,1	5,9
Fractogel EMD Propyl 650	2	91	3,8	5,7
Macro Prep Methyl	2	92	3,9	6,5
Macro Prep t Butyl	2	94	3,3	5,6
Butyl Sepharose 4 Fast Flow	2	82	4,1	6,2
Thiopropyl Sepharose 6B	2	96	4,3	6,4
Butyl-S-Sepharose 6 Fast Flow (prototipo)	2	88	3,8	5,9
Octyl Sepharose CL 4B	2	91	4,0	6,1
Phenyl Sepharose High Performance	2	77	4,3	6,3
Phenylalanin Sepharose	2	91	4,0	6,7
Hexyl S-Sepharos 6 Fast Flow	2	57	3,6	5,8
Piridyl S-Sepharose Fast Flow	2	68	3,5	5,5
<b>Geles de colorantes</b>				
Blue Hyper D	3	68	4,8	5,7
Fractogel TSK AF Green	3	60	6,1	9,3
Blue Sepharose CL 6B	3	85	3,0	5,1
Red Sepharose CL 6B	3	73	3,9	6,4
<b>Material de partida</b>	MP	-	16,8	> 90
Lysin-Sepharose 4B (columna comparativa)	1	98	6,7	11,2

20 La Tabla 1 muestra que la proporción de fragmentos de descomposición, con un período de tiempo de retención aumentado, después de una purificación del fibrinógeno utilizado a través de uno de los materiales en forma de gel que se han expuesto, aumenta en un grado manifiestamente menor que en el caso del testigo (el material de partida). La estabilidad aumentada del fibrinógeno, que se ha detectado de esta manera, en comparación con el

25 testigo (el material de partida antes de la cromatografía negativa) ya se puede comprobar manifiestamente después de 1 mes, pero luego aumenta todavía más con unos períodos de tiempo de almacenamiento más largos. Después de unos períodos de tiempo de almacenamiento más largos, de 3 meses, pero tendencialmente ya después de 2 meses, en parte también es posible realizar una discriminación entre los materiales para las columnas que son

diferentemente buenos. Incluso en comparación con la cromatografía por afinidad mediante Lysin-Sepharose 4B, que se conoce en el estado de la técnica, que empobrece al plasminógeno, se pueden conseguir todavía unos mejoramientos. Sin excepción se consiguen también unos muy buenos resultados de los rendimientos, por regla general situados por encima de aproximadamente 70 %. El Ejemplo ilustra además, que con un gran número de diferentes geles hidrófobos se puede conseguir una estabilización esencial de un fibrinógeno y por consiguiente una disminución de la formación de fragmentos de descomposición, de tal manera que se puede partir de la presunción de que, de un modo general, con unos materiales de soporte escogidos entre el conjunto que se compone de los principios de separación por cromatografía que se han mencionado, se pueden conseguir unos resultados mejorados de la estabilidad.

## Ejemplo 2:

En este Ejemplo, se ensayaron otros geles de colorantes de color azul y, adicionalmente, para el intercambiador de cationes Fractogel SO<sub>3</sub><sup>-</sup> 650 (M) y para el gel hidrófobo Phenyl Sepharose HP utilizados en el Ejemplo 1 se hicieron variar las condiciones de tamponamiento de las fases móviles. La estabilidad mejorada del fibrinógeno se determinó de nuevo por medio de la formación disminuida de fragmentos de descomposición en el transcurso de un ensayo de almacenamiento. Adicionalmente, se comprobó si se llega a un empobrecimiento de las proteínas que descomponen al fibrinógeno, o respectivamente de sus compuestos precursores inactivos (proenzimas).

Como material de partida se utilizó un fibrinógeno que, adicionalmente a la purificación análoga procedente del Ejemplo 1, después de la recogida en un disolvente acuoso adecuado (NaCl 50 mM; citrato de trisodio 20 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 7,4, tampón AM en la Tabla 2) y de manera preferida después de una diálisis frente al disolvente, se purificó todavía a través de Lysin-Sepharose.

Se utilizaron unas columnas de cromatografía (cuerpos de las columnas Ø = 0,7 cm, h = 2,5, de Qiagen), estando cargada cada una de ellas con 1,0 ml del respectivo material en forma de gel. El material en forma de gel se equilibró con los correspondientes tampones.

### Tampón de equilibración:

1a:	NaCl 50 mM,	citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM,	NaN <sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 7,5
1b:	NaCl 50 mM,	citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM,	NaN <sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 6,5
2a:	NaCl 50 mM,	citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM,	NaN <sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 6,5
2b:	NaCl 50 mM,	citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM,	NaN <sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 7,0
2c:	NaCl 50 mM,	citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM,	NaN <sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 7,5
2f:	NaCl 150 mM,	citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM,	NaN <sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 7,5
3a:	NaCl 50 mM,	citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM,	NaN <sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 6,5
3b:	NaCl 50 mM,	citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM,	NaN <sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 7,5
3c:	NaCl 500 mM,	citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM,	NaN <sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 7,5
3d:	NaCl 1.000 mM,	citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM,	NaN <sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 7,5

La solución de aplicación que contiene fibrinógeno, se adaptó eventualmente mediante una adición de NaCl y mediante un ajuste del valor del pH a las condiciones de tamponamiento antes mencionadas, y se aplicó un volumen de la solución que corresponde a una cantidad de proteína de 150 o 300 DO<sub>280-320</sub> por ml del gel (véase la Tabla 2) en el caso de una velocidad de goteo libre. Las columnas se lavaron en cada caso con 1 ml del correspondiente tampón. La solución de lavado se reunió con el respectivo material que había pasado, y se dializó frente a NaCl 50 mM, citrato de Na<sub>3</sub> 20 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 7,4, durante una noche a 4°C. El almacenamiento se efectuó a 30°C durante unos períodos de tiempo de almacenamiento de diversa duración (0 - 2 meses (me)).

El análisis se efectuó con ayuda de una SEC-HPLC tal como se ha descrito dentro del Ejemplo 1.

Adicionalmente, con ayuda de mediciones con un ELISA se determinó la cantidad del plasminógeno, del factor XI y del factor XII. El plasminógeno se fijó en un ELISA en emparejado en primer lugar a unos anticuerpos policlonales de conejo (preparado de IgG de Dade Behring), que habían sido inmovilizados como anticuerpos captadores sobre una placa de microtitulación. La detección se efectuó con ayuda del mismo preparado de anticuerpos policlonales, que, sin embargo, se había marcado con una peroxidasa. El F XII se determinó con ayuda del estuche para F XII ELISA de Kordia Life Sciences (Holanda) correspondiendo a los datos del fabricante. Asimismo, se cuantificó el F XI con el estuche para F XI ELISA de Kordia Life Sciences (Holanda) correspondiendo a los datos del fabricante.

El factor de empobrecimiento (FE) es el cociente de la cantidad de la proteína determinada (p.ej. plasminógeno, F XI o F XII) por DO<sub>280-320</sub> en el material de partida, y de la cantidad de la proteína determinada por DO<sub>280-320</sub> en la solución que contiene fibrinógeno, después de la respectiva cromatografía negativa.

Los resultados se reproducen en la Tabla 2.

Tabla 2

Material en forma de gel	Tampón	Carga de la columna DO <sub>280-320</sub>	Rendimiento (%)	$\delta$ pico 4 después de 1 me/ 30°C	$\delta$ pico 4 después de 2 me/ 30°C	FE del plasminógeno	FE del F XII	FE del F XI
Blue Hyper D	1a	150	61	1,03	2,25	3,7	21,5	2,0
Mimetic Blue SA P6XL	1a	150	94	1,18	2,68	1,6	1,3	≥ 2,2
Blue Trisacryl Plus LS	1a	150	74	1,13	2,42	2,4	22,1	≥ 2,2
Blue Sepharose 6FF	1a	150	74	1,13	2,47	4,0	9,5	≥ 2,2
	1b	150	61	1,12	2,75	2,4	12,6	≥ 2,2
Fractogel EMD SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 650	2a	150	45	1,57	2,63	3,8	12,4	≥ 2,2
	2b	150	56	1,51	2,64	3,2	15,1	≥ 2,2
	2c	150	80	1,06	2,68	1,8	1,6	≥ 2,2
	2f	150	94	1,58	3,52	2,1	1,2	≥ 2,2
Phenyl Sepharose High	3a	150	87	1,32	3,03	2,4	1,8	1,3
	3b	150	91	1,30	3,10	2,0	1,1	1,3
	3c	150	76	1,17	2,81	1,7	0,9	1,7
Performance	3d	150	66	1,09	2,69	1,8	0,9	≥ 2,2
	3b	300	96	1,43	3,27	2,0	1,2	1,5
Material de partida	MP	-	-	1,85	4,33	-	-	-

FE: factor de empobrecimiento

- 5 Como se desprende de la Tabla 2, el uso de los geles de colorantes adicionales ensayados también es adecuado para disminuir la formación de fragmentos de descomposición, es decir para conseguir una estabilidad aumentada de un fibrinógeno. Al mismo tiempo se comprueba a modo de ejemplo que mediante las cromatografías negativas utilizadas, en el caso de una correspondiente elección de los parámetros de separación, se pueden empobrecer el plasminógeno, el F XII y el F XI - si bien en diverso grado -.
- 10 Conforme a lo esperado, la eficiencia del intercambiador de cationes (Fractogel EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup> 650) muestra una dependencia con respecto de la fase móvil (la composición del tampón). En el caso de un valor del pH de aproximadamente 6,5-7,5 de la fase móvil, se puede detectar un buen empobrecimiento del plasminógeno y del F XII. En el caso de un aumento del valor del pH de la separación, la estabilidad del fibrinógeno disminuye en el caso de un almacenamiento en estado líquido, pero es todavía manifiestamente mejor que en el caso del material de partida. Puesto que, por otro lado, disminuye el rendimiento de fibrinógeno en el caso de unos valores bajos del pH, puesto que aumentan las interacciones del fibrinógeno con los grupos funcionales, y parcialmente éste ya es absorbido junto al material de la columna, en el caso del intercambiador de cationes Fractogel EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup> 650 (M) se presentan las mejores condiciones para la fase móvil en la región de valores del pH situada en torno a 7,0. Un aumento simultáneo de la concentración de sales mejora ciertamente el rendimiento de fibrinógeno, pero la estabilidad disminuye al mismo tiempo un poco. En el caso del Fractogel EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup> 650 (M) se permanecería por lo tanto de manera preferida en una concentración de sales situada en la región de aproximadamente 50 mM, y para el mejoramiento del rendimiento p.ej. se aumentaría la cantidad aplicada por ml de gel. De un modo similar, se pueden ensayar las composiciones óptimas de las fases móviles también para otros intercambiadores de cationes.
- 15
- 20
- 25 También los geles hidrófobos muestran una dependencia con respecto de la fase móvil, en particular de la concentración de sales del tampón. En el caso de Phenyl Sepharose HP, por ejemplo, dentro de un amplio intervalo de concentraciones de NaCl, se pueden conseguir por ejemplo un empobrecimiento del plasminógeno así como una estabilidad aumentada del fibrinógeno, junto con un buen rendimiento en cuanto al fibrinógeno. Todas las condiciones escogidas conducen a una estabilidad aumentada en comparación con el material de partida, de tal manera que se pueden emplear fundamentalmente de modo ventajoso varias condiciones. Todos los geles hidrófobos y/o las otras condiciones de tamponamiento se pueden optimizar de un modo similar.
- 30

35 A partir de la Tabla se puede deducir, además, que los diferentes geles en este Ejemplo contribuyen a un empobrecimiento diferentemente fuerte del plasminógeno, del F XII y del F XI. Un empobrecimiento especialmente eficiente del FXII se podía conseguir por ejemplo mediante los geles de colorantes de color azul Blue Hyper D y Blue Trisacryl Plus LS, Blue Sepharose 6FF o mediante unos intercambiadores de cationes tales como Fractogel EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup> 650 (M).

**Ejemplo 3:**

En este Ejemplo se ensayaron otros geles de colorantes, de intercambiadores de cationes e hidrófobos o respectivamente otras condiciones para la cromatografía negativa.

5 El material de partida se obtuvo según el mismo esquema de purificación que se ha descrito en el Ejemplo 2. Las columnas se equilibraron, tal como ya se ha descrito en el Ejemplo 2, con el respectivo tampón que se expone seguidamente.

- 10
- |     |                |                                   |                                       |
|-----|----------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| 1:  | NaCl 50 mM,    | citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM, | NaN <sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 7,5 |
| 2:  | NaCl 50 mM,    | citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM, | NaN <sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 7,0 |
| 3a: | NaCl 1.000 mM, | citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM, | NaN <sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 7,5 |
| 3b: | NaCl 2.000 mM, | citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM, | NaN <sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 7,5 |

15 El material de partida se dializó frente a los correspondientes tampones. Las columnas de cromatografía se cargaron en cada caso con una DO<sub>280-320</sub> de 150 o 300 (correspondiente a 15 ml o 30 ml) por cada ml del gel en el caso de una velocidad de goteo libre. Los primeros 0,5 ml de los materiales que pasaron por la columna se desecharon. Las columnas se lavaron con 1 ml del respectivo tampón. La solución de lavado se reunió con el respectivo material que había pasado, y se dializaron frente a NaCl 50 mM, citrato de Na<sub>3</sub> 20 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,05 %, de pH 7,4, durante una noche a 4°C. El almacenamiento se efectuó a 30°C durante un período de tiempo de almacenamiento de 2 meses.

20

El análisis se efectuó con ayuda de una SEC-HPLC tal como se ha descrito dentro del Ejemplo 1 y la determinación de los factores de empobrecimiento (FE) para el plasminógeno, el F XII y el F XI se efectuó tal como se ha descrito dentro del Ejemplo 2.

25

Tabla 3:

Material en forma de gel	Tampón	Carga de la columna DO <sub>280-320</sub>	Volumen de gel (ml)	Rendimiento (%)	FE del plasminógeno	FE del F XII	FE del F XI	δ pico 4 después de 2 me/ 30°C
Blue Uniflow	1	150	1,0	85	1,5	15,4	2,7	1,63
Blue Trisacryl Plus LS	1	150	1,0	77	4,8	> 45,3	> 4,3	1,55
Fractogel EMD SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 650 (M)	2	150	1,0	72	1,1	29,2	> 4,3	1,64
	2	300	1,0	82	1,5	7,7	> 4,3	2,02
Macro Prep t Butyl HIC Support	3a	150	1,0	100	0,8	1,1	1,4	2,11
	3b	150	1,0	89	1,1	1,3	1,6	2,08
Fractogel EMD Butyl 650 (S)	3a	150	1,0	91	1,4	1,5	1,8	1,63
Material de partida	MP	-	-	-	-	-	-	2,32

30 La Tabla 3 muestra que también los otros geles ensayados o respectivamente las otras condiciones se adecuan para disminuir la formación de fragmentos de descomposición. Un aumento de la cantidad aplicada (carga de la columna) conduce a un rendimiento mejorado.

**Ejemplo 4:**

35 Algunos materiales en forma de gel, que se habían acreditado como adecuados en virtud de los Ejemplos 1 hasta 3, se ensayaron en cuanto a su idoneidad a una escala mayor. Para esto, se utilizaron unas columnas de cromatografía con un volumen de gel de aproximadamente 500 ml y la solución que contenía fibrinógeno se bombeó a través de las columnas.

40 Para la obtención de una solución que contiene fibrinógeno, se elaboró un material crioprecipitado correspondiente al documento EP 0.103.196 hasta llegar a la solución pasteurizada de fibrinógeno.

La solución ahora pasteurizada de fibrinógeno se reunió con el volumen tres veces mayor de una solución de dilución (3,5 g/l de NaCl; 5,88 g/l de citrato de trisodio dihidrato en agua, de pH 7,5). Por cada litro de la solución diluida se añadieron 90 g de glicina mediando agitación. El precipitado resultante se separó mediante una centrifugación o filtración, y se desechó.

5 El material sobrenadante se aplicó opcionalmente sobre L-Lys x HCl o EACA 200 mM mediante adición de L-Lys x HCl o EACA en estado sólido. Por cada litro se añadieron otros 75 g de glicina. El precipitado rico en fibrinógeno se obtuvo mediante una centrifugación y se almacenó a -25°C hasta su elaboración ulterior.

10 Para realizar la purificación ulterior y el empobrecimiento de unas trazas de plasminógeno, se disolvió el precipitado rico en fibrinógeno y, de manera preferida después de una diálisis frente a una solución tamponadora (citrato de trisodio 20 mM, NaCl 50 mM, de pH 7,4, que contiene opcionalmente NaN<sub>3</sub> al 0,05 % como agente conservante), se bombeó a través de una columna de cromatografía con una matriz, que lleva radicales L-lisilo como ligandos. El material, que había pasado, se utilizó ulteriormente para las siguientes etapas.

15 Para realizar la separación de otros contaminantes, que influyen sobre la estabilidad del fibrinógeno, la solución que contenía fibrinógeno se bombeó a través de unas segundas columnas de cromatografía diferentes, eventualmente con una modificación previa de la composición del tampón:

20 A: La solución que contenía fibrinógeno se bombeó directamente a través de una columna (de Ø 6 cm, volumen aproximadamente 735 ml) con un gel de un colorante de color azul, que dispone de una matriz, que lleva como ligando un colorante de antraquinona derivatizado (tal como p.ej. el Blue Agarose de Prometic) y se recogió el material que había pasado. La columna se lavó posteriormente con 1 VC (volumen de la columna) de la solución tamponadora (citrato de trisodio 20 mM, NaCl 50 mM, de pH 7,4, que contenía opcionalmente NaN<sub>3</sub> al 0,05 % como agente conservante).

25 B: La solución que contenía fibrinógeno, mediante una adición de HCl 0,1 M, se ajustó a un pH de 6,7 y se bombeó directamente a través de una columna (de Ø 6 cm, volumen aproximadamente 500 ml o de Ø 6 cm, volumen de aproximadamente 147 ml) con una matriz, que lleva como ligandos unos grupos SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Fractogel EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup> 650 (M)). El material, que había pasado, se recogió. La columna se lavó posteriormente con 1 VC de la solución tamponadora (citrato de trisodio 20 mM, NaCl 50 mM, de pH 6,5, que contenía opcionalmente NaN<sub>3</sub> al 0,05 % como agente conservante).

30 C: La solución que contenía fibrinógeno, mediante una adición de NaCl cristalino, se llevó hasta una concentración final de NaCl de 1 M, y se bombeó a través de una columna (de Ø 6 cm, volumen aproximadamente 500 ml) con una matriz hidrófoba, que lleva grupos fenilo como ligandos (Phenyl Sepharose HP) y se recogió el material que había pasado. La columna se lavó posteriormente con 1 VC de la solución tamponadora (citrato de trisodio 20 mM, NaCl 1 M, de pH 7,4, que contenía opcionalmente NaN<sub>3</sub> al 0,05 % como agente conservante).

35 D: La solución que contenía fibrinógeno, mediante una adición de NaCl cristalino, se llevó hasta una concentración final de NaCl de 1 M, y se bombeó a través de una columna (de Ø 7 cm, volumen aproximadamente 577 ml) con una matriz hidrófoba, que lleva grupos fenilo como ligandos (Macro Prep t Butyl HIC Resin) y se recogió el material que había pasado. La columna se lavó posteriormente con 1 VC de la solución tamponadora (citrato de trisodio dihidrato 20 mM, NaCl 1 M, de pH 7,4, que contenía opcionalmente NaN<sub>3</sub> al 0,05 % como agente conservante).

40 Para la producción de unas formulaciones de fibrinógeno, los materiales que contienen fibrinógeno, que habían pasado, se reunieron con las respectivas soluciones de lavado, y primeramente, por medio de unos procedimientos adecuados de ultrafiltración, según fuese la utilización, se llevaron a una concentración de proteínas de aproximadamente DO<sub>280-320nm</sub> = 2 - 200, de manera preferida de aproximadamente 20 - 160, y a continuación se dializaron frente a unas soluciones, que contenían los siguientes componentes de formulación: NaCl, citrato de Na<sub>3</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, L-Arg x HCl, opcionalmente CaCl<sub>2</sub>.

45 Después de una final concentración incipiente y de una filtración en condiciones estériles, se obtuvieron unas formulaciones de fibrinógeno, que se ensayaron con ayuda de una SEC-HPLC (véase el Ejemplo 1), después de un almacenamiento durante 1 mes a 30°C, en cuanto al contenido de fragmentos de descomposición de fibrinógeno (véase la Tabla 4).

60 Tabla 4:

Material en forma de gel	Tampón	δ (≤ pico 4) después de 1 me/30°C
Blue Agarose	citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, 50 g/l de L-ArgxHCl, CaCl <sub>2</sub> 2,5 mM, de pH 7,2	0,9
Fractogel EMD SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 650 (M)	citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, 50 g/l de L-ArgxHCl, CaCl <sub>2</sub> 2,5 mM, de pH 7,2	1,0

Material en forma de gel	Tampón	$\delta$ ( $\leq$ pico 4) después de 1 me/30°C
Phenyl Sepharose High Performance	citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, 50 g/l de L-ArgxHCl, CaCl <sub>2</sub> 2,5 mM, de pH 7,2	1,2
Macroprep-t Butyl HIC Support	citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, 50 g/l de L-ArgxHCl, CaCl <sub>2</sub> 2,5 mM, de pH 7,2	1,1
Sin cromatografía negativa adicional	citrato de Na <sub>3</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, 50 g/l de L-ArgxHCl, CaCl <sub>2</sub> 2,5 mM, de pH 7,2	2,6

5 Los resultados muestran que, también a una escala mayor, mediante la utilización de unas cromatografías negativas, la diferencia de los fragmentos de descomposición, que resultan después de un almacenamiento acelerado durante 1 mes, ( $\delta$  ( $\leq$  pico 4)) se puede reducir hasta por debajo de 2 %, y que la estabilidad del fibrinógeno en solución se aumenta por consiguiente manifiestamente en el caso de un almacenamiento a 30°C.

#### Ejemplo 5:

10 En este Ejemplo se combinaron dos adsorciones negativas en el formato por tandas mediando utilización de un gel de un colorante y de un gel hidrófobo.

Para la obtención de una solución que contiene fibrinógeno, un material crioprecipitado, como material de partida, tal como se describe en el documento EP 0 103 196, se adsorbió dos veces con una suspensión de Al(OH<sub>3</sub>).

15 Para la reducción/eliminación de las proteínas contaminantes, tales como en particular proteínas que descomponen al fibrinógeno, se llevaron a cabo otras adsorciones en el formato por tandas. Para esto, se utilizó el Blue Sepharose 6 FF, que es un material en forma de gel, que lleva como ligando un colorante derivatizado de antraquinona. Por cada 10 g de la solución que contiene fibrinógeno, se añadieron 0,5 g de un gel húmedo procedente del filtro de succión (período de tiempo de agitación posterior: 90 min). A continuación, el gel de colorante se eliminó mediante centrifugación (durante 20 min a 25°C y 1.500 g).

25 El material sobrenadante que contiene fibrinógeno se sometió a una adsorción negativa adicional. Para esto, se utilizó Phenyl Sepharose HP. El material en forma de gel se empleó asimismo en la relación de 0,5 g por 10 g de la solución que contiene fibrinógeno (período de tiempo de agitación posterior: 90 min). A continuación de la adsorción, el material en forma de gel con las proteínas contaminantes fijadas se eliminó mediante centrifugación.

La subsiguiente pasteurización y la precipitación con glicina se llevaron a cabo de manera correspondiente al documento EP 0 103 196, con la excepción de que la precipitación se efectuó en presencia de Lys 200 mM.

30 Para la purificación ulterior y la eliminación del plasminógeno, el precipitado rico en fibrinógeno se disolvió primeramente en un disolvente acuoso adecuado, se filtró y, de manera preferida después de una diálisis frente a una solución tamponadora (citrato de trisodio dihidrato 20 mM, NaCl 50 mM, de pH 7,4, que contiene opcionalmente NaN<sub>3</sub> al 0,05 % como agente conservante) y de un ajuste de una densidad óptica de aproximadamente 10, se bombeó a través de una columna de cromatografía con un material en forma de gel, que lleva como ligandos unos radicales L-lisilo.

40 Para la producción de las formulaciones de fibrinógeno, la solución que contiene fibrinógeno, mediante unos procedimientos adecuados de ultrafiltración según fuese la utilización, se llevó a una concentración de proteínas de aproximadamente DO<sub>280-320nm</sub> = 2 - 200, de manera preferida de aproximadamente 20 - 160, y a continuación se dializó frente a unas soluciones, que contenían los componentes de formulación que se han mencionado en el Ejemplo 4.

45 Después de una filtración en condiciones estériles, se obtuvieron unas formulaciones de fibrinógeno, que se ensayaron en cuanto a su estabilidad con ayuda de una SEC-HPLC de una manera correspondiente al Ejemplo 1. Después de esto, tras de un almacenamiento durante 1 mes a 30°C y después de haber restado el valor cero, se midió una proporción de fragmentos de descomposición de < 1,0 %, medida con ayuda del pico 4 y de unos picos más pequeños, por lo tanto una cantidad manifiestamente más pequeña que en el caso de los correspondientes tratamientos testigos.

50 Con este Ejemplo se pudo mostrar que también se pueden usar unas adsorciones negativas en el formato por tandas, con el fin de conseguir una estabilidad lo más alta que sea posible del fibrinógeno en una solución. Además, se mostró que se pueden combinar varias adsorciones negativas. Además de esto, se puede observar que unas etapas de procedimiento con adsorciones negativas y/o cromatografías negativas se pueden integrar convenientemente en diferentes lugares en el procedimiento para la purificación del fibrinógeno. Así, en este Ejemplo, la adsorción negativa, al contrario que en los Ejemplos precedentes, se usa muy temprano en el procedimiento de purificación, directamente después del tratamiento con hidróxido de aluminio. La pasteurización, la precipitación con glicina y la eliminación de más cantidad de plasminógeno por medio de Lysin-Sepharose se efectuaron tan sólo a continuación de esto.

**Ejemplo 6:**

5 En este Ejemplo se investigó hasta qué punto se pueden empobrecer las proteínas que descomponen al fibrinógeno, con ayuda de una ultrafiltración, mediante elección de unos tamaños de poros adecuados.

Para la obtención de una solución que contiene fibrinógeno, se procedió de una manera correspondiente a la del Ejemplo 1, inclusive la producción de un precipitado depositado, pasteurizado.

10 Para la purificación y el empobrecimiento ulteriores de las proteínas que descomponen al fibrinógeno, el precipitado rico en fibrinógeno se disolvió primeramente en un disolvente acuoso adecuado y mediando empleo de unas membranas de ultrafiltración con un límite de corte de 300 kDa, se diafiltró intensamente frente a una solución tamponadora (citrato de trisodio dihidrato 20 mM, NaCl 50 mM, de pH 7,4, que contiene opcionalmente NaN<sub>3</sub> al 0,05 % como agente conservante).

15 A continuación, la solución destinada a la eliminación del plasminógeno se bombeo a través de una columna de cromatografía con un material en forma de gel, que contiene como ligandos radicales L-lisilo.

20 Para la producción de formulaciones de fibrinógeno, la solución que contenía fibrinógeno se llevó primeramente mediante adecuados procedimientos de ultrafiltración y adecuadas membranas (límite de corte = 300 kDa), según fuese la utilización, hasta una concentración de proteínas de aproximadamente DO<sub>280-320nm</sub> = 2 - 200, de manera preferida de aproximadamente 20 - 160, y a continuación se dializó frente a unas soluciones, que contenían unos adecuados componentes de formulación.

25 Después de una concentración final y de una filtración en condiciones estériles, se obtuvieron unas formulaciones de fibrinógeno, que se ensayaron en cuanto al contenido de fragmentos de descomposición de fibrinógeno con ayuda de la SEC-HPLC (véase el Ejemplo 1), antes del comienzo del almacenamiento y después de un almacenamiento durante 1 mes a 30°C. Después de esto, tras de haber restado el valor cero, resultó una cantidad de fragmentos de descomposición disminuida en comparación con un testigo con una ultrafiltración habitual.

30 Por consiguiente, se pudo demostrar que mediante ultrafiltración con un límite de corte de 300 kDa se pudo empobrecer de otras proteínas adicionales, que descomponen al fibrinógeno, y que se puede producir un concentrado más estable de fibrinógeno.

**Ejemplo 7:**

35 Como se describe en el Ejemplo 1, se produjo un precipitado de fibrinógeno y se purificó adicionalmente mediante una cromatografía negativa en presencia de Lys-Sepharose. Después de haber aumentado la concentración hasta 1 mol de cloruro de sodio por litro de la solución de fibrinógeno, ésta se vertió en una columna de cromatografía rellena con Butyl-Sepharose y se enjuagó posteriormente con el tampón. EL material, que había pasado por la columna, se aumentó de concentración, se dializó y se ensayó en cuanto a los contenidos de t-PA, plasminógeno y F XI. Como testigo se llevó a cabo una elaboración comparativa, en la que no se llevó a cabo la cromatografía negativa en presencia de Butyl-Sepharose. Como resultado se pudo demostrar, que mediante la HIC adicional se pudieron reducir manifiestamente las concentraciones de t-PA, plasminógeno y F XI, y que ha aumentado la estabilidad después de un almacenamiento a 30°C (la proporción de fragmentos de fibrinógeno después de 1 mes a 30°C era menor en aproximadamente un 20 %, cuando se llevó a cabo la HIC).

	t-PA (ng/DO280-320)	Plasminógeno (ng/DO280-320)	F XI (ng/DO280-320)	Fragmentos de fibrinógeno después de 1 mes a 30°C (elaboración sin HIC = 100 %)
Elaboración sin HIC	0,046	2,47	0,069	100 %
Elaboración inclusive una HIC	0,003	2,04	0,038	79 %

**Ejemplo 8:**

50 Como se ha descrito en el Ejemplo 1, se produce un precipitado de fibrinógeno y se purifica mediante una cromatografía negativa en presencia de Lys-Sepharose. La purificación ulterior se efectúa mediante una columna de un colorante, una HIC y/o un intercambiador de cationes. La solución de fibrinógeno se transfiere mediante una diafiltración y una ultrafiltración a los siguientes tampones de formulación y, después de una filtración en condiciones estériles, se almacena aceleradamente a 30°C:

- 60 1. Citrato de Na<sub>3</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, 50 g/l de L-Arg x HCl, de pH 7,2  
2. Citrato de Na<sub>3</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, 70 g/l de L-Arg x HCl, de pH 7,2

3. Citrato de Na<sub>3</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, 100 g/l de L-Arg x HCl, de pH 7,2  
 4. Citrato de Na<sub>3</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, 50 g/l de L-Arg x HCl, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, de pH 7,2  
 5. Citrato de Na<sub>3</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, 70 g/l de L-Arg x HCl, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, de pH 7,2  
 6. Citrato de Na<sub>3</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, 100 g/l de L-Arg x HCl, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, de pH 7,2  
 7. Citrato de Na<sub>3</sub> 4 mM, NaCl 100 mM, 50 g/l de L-Arg x HCl, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, de pH 7,2  
 8. Citrato de Na<sub>3</sub> 12 mM, NaCl 100 mM, 50 g/l de L-Arg x HCl, CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM, de pH 7,2  
 9. Citrato de Na<sub>3</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, 50 g/l de L-Arg x HCl, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, de pH 7,2  
 10. Citrato de Na<sub>3</sub> 20 mM, NaCl 200 mM, 50 g/l de L-Arg x HCl, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, de pH 7,2  
 11. Citrato de Na<sub>3</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, 70 g/l de L-Arg x HCl, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, de pH 6,8  
 12. Citrato de Na<sub>3</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, 60 g/l de L-Arg x HCl, L-His al 1 %, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, de pH 7,2  
 13. Citrato de Na<sub>3</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, 60 g/l de L-Arg x HCl, L-His al 2 %, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, de pH 7,2  
 14. Citrato de Na<sub>3</sub> 4 mM, NaCl 100 mM, 60 g/l de L-Arg x HCl, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, de pH 7,2  
 15. Citrato de Na<sub>3</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, 60 g/l de L-Arg x HCl, ácido aminobenzoico 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, de pH 7,2  
 16. Citrato de Na<sub>3</sub> 4 mM, NaCl 100 mM, 60 g/l de L-Arg x HCl, de pH 7,2  
 17. Citrato de Na<sub>3</sub> 4 mM, NaCl 100 mM, 60 g/l de L-Arg x HCl, L-His al 2 %, de pH 7,2  
 18. Citrato de Na<sub>3</sub> 4 mM, NaCl 100 mM, 60 g/l de L-Arg x HCl, L-His al 2 %, de pH 6,4  
 19. Citrato de Na<sub>3</sub> 4 mM, NaCl 100 mM, 60 g/l de L-Arg x HCl, L-His al 2 %, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, de pH 7,2  
 20. Citrato de Na<sub>3</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, 60 g/l de L-Arg x HCl, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, de pH 7,2

La estabilidad de las formulaciones expuestas es muy buena y se observa una formación de fragmentos solamente en un grado muy pequeño (resulta menos que 2 % de fragmentos ( $\delta \leq$  pico 4)) durante un almacenamiento durante un mes a 30°C). Las soluciones son adecuadas para servir como un componente de un pegamento de fibrina almacenable en el estado líquido, que se compone de dos o más componentes.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la purificación de unas soluciones que contienen fibrinógeno, **caracterizado por que** contiene una o varias etapas de procedimiento, en la(s) que se empobrece(n) una o varias proteínas contaminantes mediante una o varias cromatografías negativas y/o una o varias adsorciones negativas, en cada caso mediando utilización de un gel de un colorante, llevándose a cabo la cromatografía negativa y/o la adsorción negativa a un valor del pH comprendido entre 5,5 y 9.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** como gel de un colorante se utiliza un gel de un colorante de color azul.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** como gel de un colorante se utiliza un gel de un colorante de color rojo o verde.
- 15 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 3, **caracterizado por que** en el caso del gel de un colorante se trata de Blue Hyper D, Mimetic Blue Agarose, Mimetic Blue SA P6XL, Mimetic Blue 1 P6XL, Blue Trisacryl Plus LS, Blue Uniflow, Blue Sepharose 6FF, Blue Sepharose CL 6B, Red Sepharose CL 6B, Fractogel TSK AF Green y/o Matrex gel Green A.
- 20 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 4, **caracterizado por que** el rendimiento de fibrinógeno en el material que ha pasado en la cromatografía negativa o en el material sobrenadante de la adsorción negativa es  $\geq 50 \%$ , de manera preferida  $\geq 70 \%$ .
- 25 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 5, **caracterizado por que** la etapa de procedimiento que contiene la adsorción o cromatografía negativa, se lleva a cabo en presencia de unas sustancias, que debilitan la fijación de plasminógeno a un fibrinógeno.
- 30 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 6, **caracterizado por que** como material de partida se utiliza una mezcla obtenida a partir de sangre, de una leche de animales transgénicos o del material sobrenadante de la fermentación o de una fracción producida a partir de éste.
- 35 8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** como material de partida se utiliza un plasma humano, una fracción de plasma o un material crioprecipitado.
9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 8, **caracterizado por que** están contenidas una o varias etapas de procedimiento, en las que se precipita un fibrinógeno.
- 40 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado por que** están contenidas una o varias precipitaciones con glicina o con otros aminoácidos.
11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 10, **caracterizado por que** están contenidas una o varias etapas de procedimiento, en las que se elimina el plasminógeno, a través de un material en forma de gel, con lisina o con compuestos análogos a la lisina como grupos funcionales.
- 45 12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 11, **caracterizado por que** están contenidas una o varias etapas de procedimiento para el empobrecimiento y/o la eliminación de partículas infecciosas.
- 50 13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 12, en el que se combinan las siguientes etapas de procedimiento: producción de una fracción de plasma, una adsorción junto a hidróxido de aluminio, una desactivación de partículas infecciosas tales como, por ejemplo, virus, una precipitación, otras etapas adicionales de purificación y/o desactivación, una cromatografía negativa y/o una adsorción negativa, una ultrafiltración y una filtración en condiciones estériles.

55

SEC-HPLC de una muestra purificada mediante una HIC (655-11-109W) antes del almacenamiento

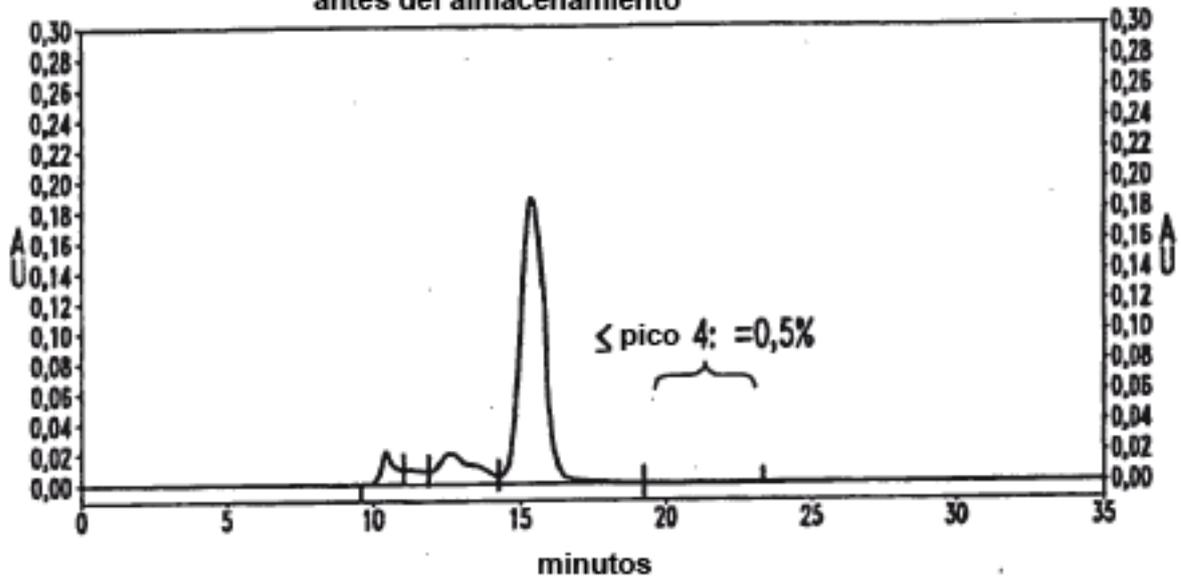


Fig.1a

SEC-HPLC de una muestra purificada mediante una HIC después de un almacenamiento durante 2 meses a 30 °C (655-11-109W (t=2me/30°C))

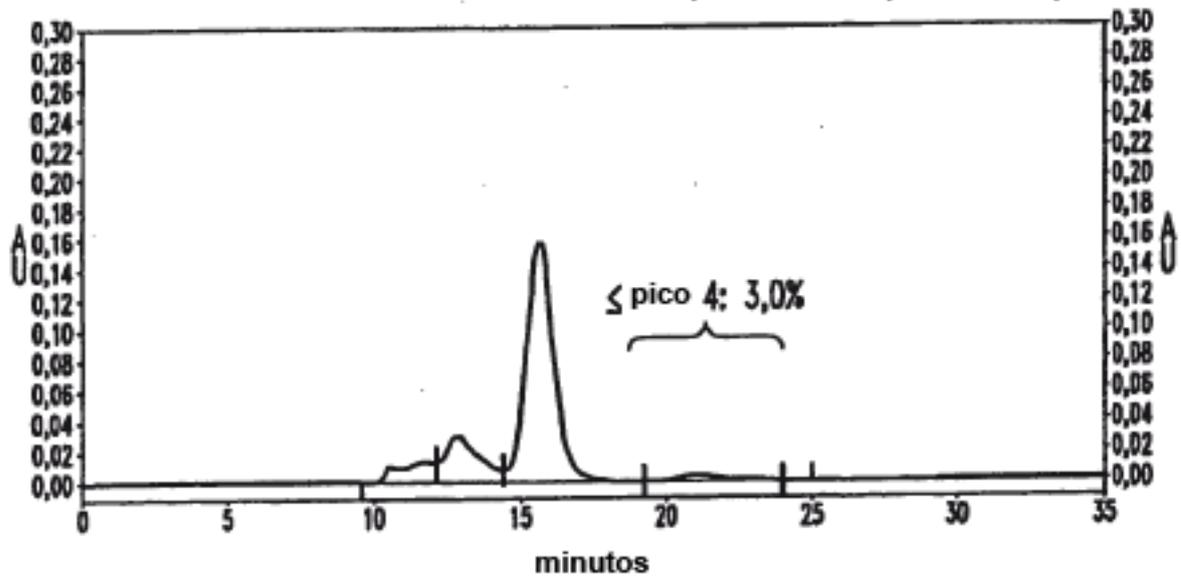


Fig.1b

SEC-HPLC de una muestra purificada mediante una HIC después de un almacenamiento durante 2 meses a 30 °C (655-11-075W3 (t=2me/30°C))

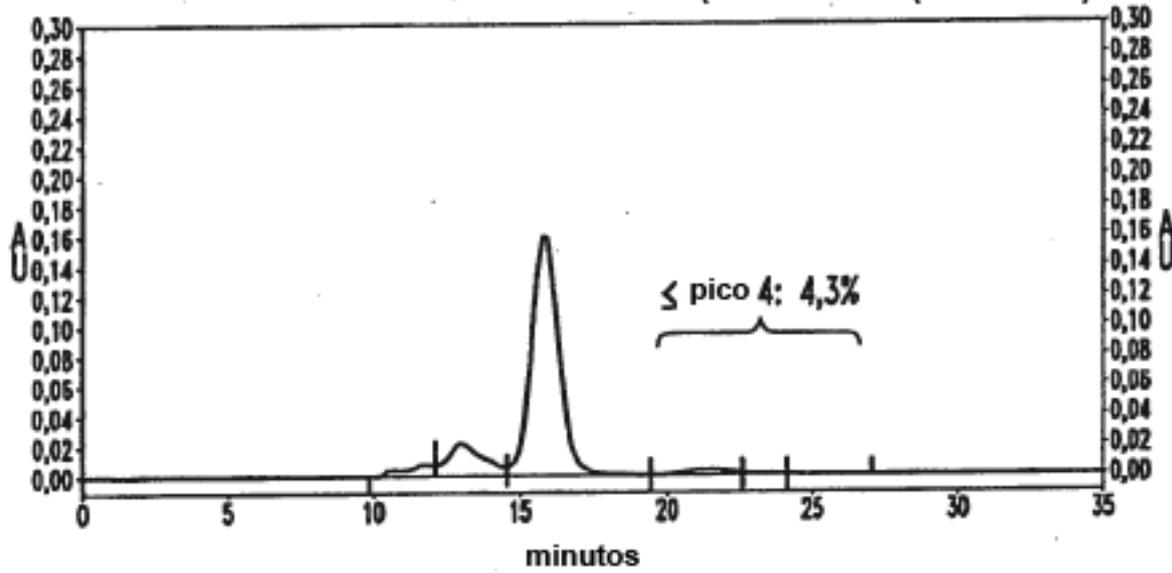


Fig.1c