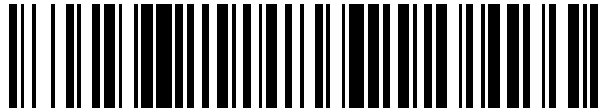


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 376**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2008 E 08717761 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 2134838**

54 Título: **Concentrado de proteína C que contiene la proteína S, su preparación y su uso**

30 Prioridad:

15.03.2007 IT FI20070063

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

25.07.2013

73 Titular/es:

**KEDRION S.P.A. (100.0%)
LOCALITA' AI CONTI 5
55051 CASTELVECCHIO PASCOLI - , IT**

72 Inventor/es:

**ANGELINI, CRISTINA;
FARINA, CLAUDIO;
NARDINI, CLAUDIA y
FRANCESCHINI, RODOLFO**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 415 376 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

Concentrado de proteína C que contiene la proteína S, su preparación y su uso

5 **Campo de la invención**

[0001] La invención se relaciona con el campo de la purificación de proteínas de plasma humano y su uso.

Estado de la técnica

10

[0002] La proteína C es un zimógeno de la serina proteasa dependiente de vitamina K que, junto con su cofactor, la Proteína S, realiza una función fundamental en la regulación de la hemostasis en condiciones tanto fisiológicas como si el sistema está alterado debido a una afección patológica. La activación de la Proteína C se produce mediante el complejo trombina-trombomodulina y se acelera aproximadamente 20 veces cuando la Proteína C está formando el complejo con el EPCR (receptor de Proteína C endotelial celular). La Proteína C activada se une a la Proteína S y después continúa ejerciendo su efecto proteolítico en los factores Va y VIIIa, así como en sus respectivos precursores inactivos, ejerciendo así su función de anticoagulación. La Proteína C activada también tiene una acción profibrinolítica dado que inactiva PAI-1 y TAFI (inhibidor de fibrinólisis activable por trombina) y una acción antiinflamatoria ya que, cuando forma complejo con el receptor EPCR, inhibe la liberación de citocinas inflamatorias (factor de necrosis tumoral, interleucina 6) de los monocitos inhibiendo una transcriptasa nuclear (NF-kB) implicada en la liberación de dichas citocinas y en la migración y adhesión de neutrófilos (Esmon T. et al. "The Protein C Pathway" Crit Care Med 28, No. 9 (Supl.), S44-S48 (2000); Esmon T et al. "Protein C anticoagulant pathway and its role in controlling microvascular thrombosis and inflammation" Crit Care Med 29, No. 7 (Supl.), S48-S51 (2001)).

15

20

25

[0003] La Proteína S realiza una acción anticoagulante como un cofactor de la Proteína C activada y también tiene una acción anticoagulante independiente debido a la inhibición del complejo protrombinasa (Factor Xa, Factor Va y Protrombina) y del complejo tenasa (Factor IXa, Factor VIIIa, iones calcio y Factor X). Cuando forma complejo con C4BP, la Proteína S también presenta acción antiinflamatoria que se produjo localizando el complejo Proteína S-proteína de unión a C4 en la superficie de células apoptóticas que expresan fosfatidilserina, facilitando así la eliminación de estas células por macrófagos antes de su rotura y posterior liberación de fuertes moléculas intracelulares proinflamatorias, y aumentando la unión de C4BP en las superficies de neutrófilos para regular la proliferación del complemento en sitios de activación del sistema de coagulación (Rigby A. C. y al. "Protein S: A conduit between anticoagulation and inflammation" Crit Care Med 32, No. 5, S336-S341 (2004); Webb JH y al. "Vitamin K-dependent Protein S localizing complement regulator C4b-binding protein to the surface of apoptotic cells" J Immunol.169, 2580-2586 (2002); Anderson HA et al. "Serum-derived Protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells" Nat. Immunol. 4, 87-91 (2003); Rezende S.M. y al. "Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for Protein S and the Protein S-C4b binding Protein Complex" Blood 13, No. 4, 1192-1201, (2004)).

30

35

40

[0004] La septicemia es una afección patológica compleja caracterizada por una reacción inflamatoria sistémica que puede desencadenarse por infecciones bacterianas, fúngicas o virales, por múltiples traumatismos, quemaduras graves o trasplantes de órganos cuyo pronóstico es frecuentemente letal. Los sistemas hemostático y fibrinolítico están muy implicados en la patofisiología de la septicemia. En la septicemia, la inflamación y la coagulación están mutuamente amplificadas conduciendo a la isquemia de la microcirculación y disfunción orgánica. Los pacientes con septicemia muestran niveles en sangre alterados de diversos factores de coagulación, en particular una reducción en cuanto a los niveles de Proteína C y S, estableciéndose un estado de hipercoagulabilidad consecuente debido a la capacidad de esta ruta de anticoagulación de regular la producción de protrombina que está comprometida. Las variaciones en los niveles de sangre de estos factores son un indicador de gravedad de lesión trombótica y se correlacionan con pronóstico, habiendo una correlación inversamente proporcional entre niveles plasmáticos y mortalidad (Fourrier F. et al. "Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation: Compared patterns of antithrombin III, Protein C, and Protein S deficiencies" Chest 101, 816-823 (1992); Fisher CJ Jr "Protein C levels as a prognostic indicator of outcome in sepsis and related diseases" Cri. Care Med. 28 (9 Supl), S49-S56 (2000); La Rosa SP et al. "Decreased Protein C, Protein S, and antithrombin levels are predictive of poor outcome in Gram-negative sepsis caused by Burkholderia pseudomallei" Int J Infect Dis.1 0 (1), 25-31 (2006)). La Proteína C activada es el único fármaco actualmente autorizado para su uso en septicemia y es activo a concentraciones para fisiológicas. Sin embargo, este fármaco presenta diversas contraindicaciones debido al alto riesgo hemorrágico asociado con el mismo, que excluye su uso en muchos pacientes septicémicos y en pacientes pediátricos. Adicionalmente, en un estudio reciente, controlado por placebo, con doble ocultación, al azar, la activación de la Proteína C también se demostró en septicemia meningocócica en la que se había supuesto una activación reducida, una opinión derivada de la hipótesis de que las citocinas inflamatorias producidas durante la septicemia modulan la regulación negativa de la trombomodulina y del EPCR (De Kleijn ED et al. "Activation of Protein C following infusion of Protein C concentrate in children with severe meningococcal sepsis and purpura fulminans: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, dose-finding study" Crit Care Med. 31 (6), 1839-47 (2003)).

45

50

55

60

65

[0005] Diversos ensayos clínicos realizados usando un concentrado de Proteína C en meningococemia han demostrado una morbilidad y una mortalidad significativamente reducidas en las diversas poblaciones estudiadas. En todos los casos descritos se registró un aumento en los niveles plasmáticos de Proteína C activada, así como una tendencia a normalizar parámetros de coagulación relacionados y una mejoría en el desenlace final. No se registraron reacciones adversas ni complicaciones hemorrágicas, especialmente en pacientes pediátricos (White B et al. "An open-label study of the role of adjuvant hemostatic support with Protein C replacement therapy in purpura fulminans-associated meningococemia" Blood 96, 3719-3724 (2000); De Kleijn ED et al. "Activation of Protein C following infusion of Protein C concentrate in children with severe meningococcal sepsis and purpura fulminans: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, dose-finding study" Crit Care Med. 31(6), 1839-47 (2003); Baratto et al. "Use of Protein C concentrate in adult patients with severe sepsis and septic shock" Minerva Anesthesiol 70, 351-6 (2004); Pettenazzo et al. "Use of Protein C concentrate in critical conditions: clinical experience in pediatric patients with sepsis" Minerva Anesthesiol. 70(5), 357-63 (2004); Silvani P et al. "Use of Protein C in pediatric patients with sepsis" Minerva Anesthesiol. 71, 373-78 (2005); Schellongowski P. et al. "Treatment of adult patients with sepsis-induced coagulopathy and purpura fulminans using a plasma-derived Protein C concentrate (Ceprotin)" Vox Sanguinis 90, 294-301 (2006); etc.). La administración de un concentrado de Proteína C que contuviese Proteína S aún no era objeto de ningún ensayo clínico, a pesar de la presencia de la Proteína S en el concentrado proporcionando una protección adicional contra episodios trombóticos. Además es razonable suponer un efecto sinérgico entre las dos proteínas corrigiendo al menos en parte cualquier desequilibrio de sistema hemostático y mejorando la situación clínica general reduciendo la liberación de citocinas proinflamatorias, y por tanto suponer la posible aplicación terapéutica de un concentrado de Proteína C y Proteína S en septicemia, particularmente en casos en los que la administración de la Proteína C recombinante activada está contundentemente contraindicada debido a su alto riesgo hemorrágico, como es el caso de los pacientes pediátricos (ensayo RESOLVE).

[0006] Además de la ausencia de riesgos hemorrágicos, un concentrado de Proteína C que contenga Proteína S presenta una ventaja adicional en comparación con la Proteína C recombinada activada, en concreto el coste de producción indudablemente inferior y por tanto del tratamiento completo por paciente.

[0007] Radosevich M. et al. (J. Chromatography B: Biomed. Sc. & Appl. 2003, 790, 199-207) desvelan un proceso para la preparación de un concentrado de proteína C a partir de crio-plasma pobre mediante un procedimiento cromatográfico de cuatro etapas. El método descrito utiliza una fracción residual de la purificación del factor IX a partir del plasma humano congelado. La última etapa cromatográfica se realiza por afinidad en heparin-sepharose CL6B. El producto obtenido mediante este procedimiento es rico en proteína C (pero contiene menos de 0,01 UI/ml de proteína S).

[0008] Sin embargo, en el mercado puede adquirirse un producto que consiste en Proteína C humana, en el que la Proteína S está ausente.

Sumario de la invención

[0009] La invención se refiere a un proceso para obtener un concentrado de Proteína C que también comprende la Proteína S en el que:

- a) la fracción recogida después del segundo lavado de la resina DEAE-Sepharose usada para obtener el Complejo de Protrombina (CPT) purificado a partir de plasma humano congelado se dializa con un tampón adecuado y se concentra;
- b) el producto derivado de la etapa anterior se somete a cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico débil, y el pH del eluato que contiene las proteínas de interés se ajusta, seguido de diálisis con el tampón de acondicionamiento de la resina utilizada en la segunda etapa cromatográfica;
- c) se realiza una segunda etapa cromatográfica sobre una resina que se une selectivamente a la Proteína C y a la Proteína S, en el que dicha resina es hidroxipatita;
- d) la mezcla de proteínas purificada obtenida de esta manera se dializa con un tampón de formulación adecuado, después se prefiltra, se nanofiltrar y se liofiliza.

Breve descripción de la figura

[0010] La Figura 1 muestra las diversas etapas del proceso de la invención en una forma esquemática.

Descripción detallada de la invención

[0011] La invención se refiere a un método para purificar, a partir de plasma humano, un concentrado de Proteína C que contiene Proteína S y el producto obtenido de esta manera.

[0012] El material de partida para este nuevo método de purificación es la fracción recogida del segundo lavado de la resina DEAE- Sepharose usada para obtener el Complejo de Protrombina (CPT) a partir de plasma humano congelado mediante un proceso conocido. Esta fracción es normalmente una fracción residual de dicho proceso de producción. La fracción de lavado usada como material de partida, que previamente ya se ha sometido a una etapa

de inactivación viral por tratamiento con disolvente/detergente (D/D) se dializa después con un tampón adecuado y se somete a cromatografía con una resina de intercambio aniónico débil; después, las proteínas de interés que permanecen fijadas a la resina se diluyen con un tampón de mayor fuerza iónica.

5 **[0013]** El eluato que contiene las proteínas de interés se diafiltra usando el tampón de acondicionamiento de la resina utilizada en la segunda etapa cromatográfica a un pH casi neutro.

10 **[0014]** La segunda etapa cromatográfica utiliza una resina que puede unir selectivamente a las proteínas C y S y, después de eluir con un tampón adecuado de alta fuerza iónica, proporciona un concentrado purificado de las dos proteínas de interés.

[0015] La mezcla de proteínas purificada obtenida de esta manera se diafiltra con un tampón de formulación adecuado, después se prefiltra, se nanofiltrar y se liofiliza.

15 **[0016]** El liofilizado obtenido de esta manera se conserva a 4 °C.

20 **[0017]** El producto final obtenido de esta manera se somete a dos procesos de inactivación/reducción viral (tratamiento con disolvente/detergente y nanofiltración) que garantiza la eliminación de virus con envoltura y sin ella, permitiendo así cumplir totalmente con los perfiles de seguridad actuales para virus.

25 **[0018]** El producto liofilizado, a reconstituir con WFI, se destina para administración parenteral, preferentemente intravenosa. La dosis de Proteína C a administrar es muy variable de un paciente a otro porque la dosificación debe ser de tal manera que se restablezcan inmediatamente niveles más altos de Proteína C en el paciente en comparación con los niveles normales y después mantener dichos valores dentro de un intervalo normal mediante un control continuo.

30 **[0019]** Una posible dosificación para el tratamiento de la septicemia es de 50-500 UI/kg/día. De acuerdo con la invención la solución de lavado utilizada como material de partida se dializa usando un tampón citrato, preferentemente citrato 20 mM que contiene NaCl 100 mM a pH 7.

[0020] La resina utilizada en la primera etapa cromatográfica es una resina de intercambio aniónico débil, preferentemente Fractogel EMD DMAE. El tampón utilizado para eluir la proteína C y la Proteína S es un tampón a pH ácido, preferentemente citrato que contiene NaCl 200 mM.

35 **[0021]** La resina utilizada en la segunda etapa cromatográfica es hidroxiapatita que es una resina que puede unirse selectivamente a las Proteínas C y S; el tampón de acondicionamiento relativo es un tampón fosfato, preferentemente fosfato 10 mM que contiene NaCl 100 mM a pH 6,8. Las proteínas de interés se eluyen con tampón fosfato al mismo pH y a concentraciones mayores de NaCl, preferentemente 300 mM.

40 **[0022]** Finalmente el tampón de formulación utilizado para la diálisis después de la segunda cromatografía consiste en citrato, preferentemente citrato 20 mM que contiene NaCl 100 mM y lisina 3 g/l a pH 7.

45 **[0023]** El producto obtenido consiste en una solución que contiene 50 U/ml \pm 10 de Proteína C, > 5 U/ml de Proteína S, < 0,4 U/ml de factor II, < 0,5 U/ml de factor X y < 0,05 U/ml de factor IX.

Ejemplo 1

50 **[0024]** Se dializaron 2250 ml de la fracción recogida después del segundo lavado de la resina DEAE-Sepharose usada para obtener el Complejo de Protrombina (CPT) purificado a partir de plasma humano congelado, con tampón citrato 20 mM, NaCl 100 mM a pH $7 \pm 0,2$ y se concentraron aproximadamente 15 veces. Después se realizó la cromatografía en una resina de intercambio aniónico (Fractogel EMD DMAE 45 ml), eluyendo las proteínas de interés con tampón citrato 20 mM, NaCl 200 mM a pH $5 \pm 0,2$. El pH del eluato se ajustó a $7 \pm 0,2$ y la diálisis se realizó con tampón fosfato 10 mM, NaCl 100 mM a pH $6,8 \pm 0,2$ seguido de cromatografía en una columna que contenía 13 ml de hidroxiapatita de cerámica CHT de Tipo I. La elución en la segunda etapa cromatográfica se realizó con tampón fosfato 10 mM, NaCl 300 mM a pH $6,8 \pm 0,2$. Cuando finalizó, la mezcla de proteína purificada obtenida de esta manera se dializó con el tampón de formulación (citrato 20 mM, NaCl 100 mM a pH $7 \pm 0,2$) y se concentró, si fuera necesario, para obtener una solución que tenía una concentración de Proteína C entre 40 y 60 U/ml, después se prefiltró a través de un filtro de 0,22 μ m, se nanofiltró a través de un filtro de 20 nm, se distribuyó en viales y se liofilizó. El volumen de la solución distribuida en los diversos viales es de 10 ml, para obtener 60 aproximadamente 500 ± 100 unidades de Proteína C por vial. El liofilizado obtenido de esta manera se conservó a 4 °C.

ES 2 415 376 T3

Esquema resumen del ciclo del proceso de purificación

Proceso de purificación	Volumen (ml)	Una sola etapa % de recuperación de Proteína C	% de recuperación de Proteína C en comparación con la cantidad inicial	Actividad específica (U/mg)
Material de partida (fracción de lavado DEAE-Sepharose)	2250			
Diafiltración	160	100	100	3,25
Cromatografía sobre Fractogel DMAE	171	76,9	76,9	28,5
Cromatografía sobre hidroxapatita CHT	50	58,1	41,2	204,2
Diálisis y nanofiltración	56	72,8	30,0	202,5
Liofilización	56	90,6		186,7

Tabla resumen de características del producto final

Parámetro	Método de análisis	Especificación
U total de Proteína C	Ensayo Cromogénico	50 U/ml ± 10
Actividad específica de Proteína C	Ensayo Cromogénico	180 U/mg
U total de Proteína S	Ensayo Elisa	>5 U/ml
U total de Protrombina	Ensayo Cromogénico	< 0,4 U/ml
U total de Factor X	Ensayo Elisa	<0,5 U/ml
U total de Factor IX	Ensayo de Coagulación	<0,05 U/ml

REIVINDICACIONES

1. Proceso para obtener un concentrado de Proteína C que también comprende la Proteína S en el que:
- 5 a) la fracción recogida después del segundo lavado de la resina DEAE-Sepharose usada para obtener el Complejo de Protrombina (CPT) purificado a partir de plasma humano congelado se dializa con un tampón adecuado y se concentra;
- 10 b) el producto derivado de la etapa anterior se somete a cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico débil, y el pH del eluato que contiene las proteínas de interés se ajusta, seguido de diálisis con el tampón de acondicionamiento de la resina utilizada en la segunda etapa cromatográfica;
- 15 c) se realiza una segunda etapa cromatográfica sobre una resina que se une selectivamente a la Proteína C y a la Proteína S, en el que dicha resina es hidroxiapatita;
- d) la mezcla de proteínas purificada obtenida de esta manera se dializa con un tampón de formulación adecuado, después se prefiltra, se nanofiltrar y se liofiliza.
2. Concentrado de Proteína C que también comprende la Proteína S obtenida por el proceso de la reivindicación 1.
3. Concentrado de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el contenido de Proteína S es igual a al menos el 10% (calculado en U/ml) del contenido de la Proteína C.
- 20 4. Concentrado de acuerdo con la reivindicación 3 en el que el contenido de Factor II, Factor X y Factor IX es < 0,5 U/ml.
- 25 5. Concentrado de acuerdo con la reivindicación 4 en el que el contenido de Proteína C es de 40-60 U/ml, el contenido de Proteína S es > 5 U/ml y el contenido de Factor II, Factor X y Factor IX es < 0,5 U/ml.
- 30 6. El uso del concentrado de acuerdo con las reivindicaciones 2-5 para la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de septicemia así como para deficiencia congénita de Proteína C y Proteína S.
- 35 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 en el que dichas formulaciones están en una forma para la administración parenteral.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 en el que dicha formulación consiste en un liofilizado de la solución que contiene la Proteína C y la Proteína S, y WFI para su reconstitución.

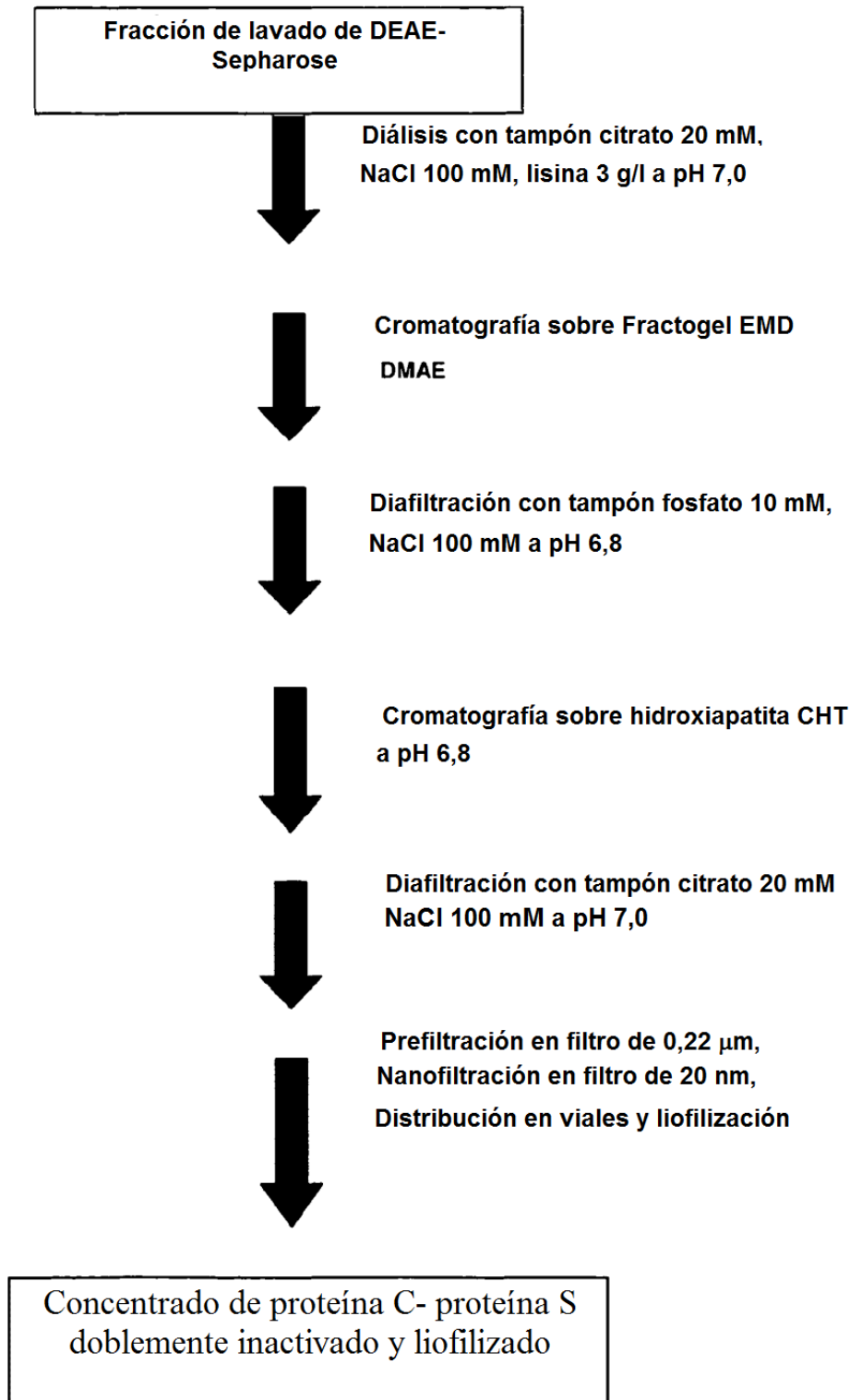


Fig. 1