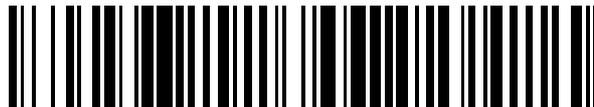


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 815**

51 Int. Cl.:

A61K 38/36 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2003 E 03781990 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 1572229**

54 Título: **Fibrinógeno terapéutico estable**

30 Prioridad:

18.12.2002 AT 18902002

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

15.07.2014

73 Titular/es:

**BIO & BIO LICENSING SA (100.0%)
2 bis, rue Astrid
1143 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es:

EIBL, JOHANN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 476 815 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

Fibrinógeno terapéutico estable

Introducción

5 Las proteínas terapéuticas se usan en medicina desde hace más de 100 años y siguen ganando interés e importancia en la medicina. Comparaciones con otras sustancias farmacéuticas activas dan como resultado que las proteínas terapéuticas como sustancias albuminoideas presentan una estabilidad considerablemente menor y un mayor grado de impurezas. Las proteínas terapéuticas también presentan en comparación con otros principios activos farmacéuticos una sensibilidad relativamente elevada frente a diferentes factores químicos y físicos, en particular frente a enzimas tales como proteasas, que escinden enlaces peptídicos. Por tanto, todas las medidas que
10 en la obtención, la purificación y el almacenamiento de proteínas terapéuticas intactas contribuyen a mantener su integridad y estabilidad son de gran importancia económica.

15 Las modificaciones de proteínas terapéuticas, y esto es aplicable a todas las proteínas, pueden tener lugar mediante transposición intramolecular o mediante reacciones químicas, tales como escisión o formación de enlaces covalentes. Una enzima, que reconoce una proteína terapéutica como su sustrato, puede modificar la misma en gran medida y, siempre que no se trate de una proteasa, provocar una o varias escisiones en la cadena peptídica de la proteína. Ya en los materiales de partida para la producción de proteínas terapéuticas tanto naturales como obtenidas mediante ingeniería genética pueden estar contenidas tales enzimas, así como sus precursores, que se denominan proenzimas, o en el caso de las proteasas, también zimógenos. Las enzimas que actúan sobre proteínas son en la mayoría de los casos proteínas ellas mismas y pueden encontrarse tanto libres como ya unidas a sus sustratos. Los zimógenos también pueden encontrarse como sustratos o estar ya unidos con sus enzimas específicas, que las convierten en proteasas.

20 Las acciones enzimáticas sobre las proteínas terapéuticas durante su producción y almacenamiento, partiendo del producto de partida hasta el producto terminado, pueden conducir a pérdidas elevadas y productos finales lábiles (Anderson *et al.* 1986; Eaton *et al.* 1986; Brummel *et al.* 1999).

25 Ya en muchos materiales de partida están presentes enzimas, que actúan sobre las proteínas terapéuticas, así como sus proenzimas y procofactores, que durante la operación de purificación conduce a una formación adicional de tales enzimas mediante activación. Los procofactores son igualmente proteínas, que mediante la acción de proteasas se degradan para dar cofactores, pero que no son enzimas en sí mismas. Los cofactores aumentan de manera específica determinadas actividades proteasa en un múltiplo.

30 Tales enzimas, proenzimas, cofactores o procofactores pueden emplearse en sí mismos como proteínas terapéuticas, siempre y cuando los agentes patógenos virales, tal como pueden encontrarse en la sangre o biomasas obtenidas mediante ingeniería genética, se inactiven o se agoten mediante operaciones de inactivación o de eliminación en el transcurso de la producción de la sustancia activa farmacéutica.

35 La cascada de coagulación de sangre es uno de los sistemas enzimáticos mejor conocidos. Se desencadena por un cofactor enzimático, el factor tisular que contiene lípidos, que aumenta la actividad enzimática del factor de coagulación VIIa en un múltiplo. El factor tisular aparece normalmente sólo en células y por ello no puede interactuar con el factor de coagulación VIIa. Debido a acontecimientos patológicos o traumáticos, el factor tisular puede llegar a la superficie de células que contienen factor tisular, o salir de estas células. Con las cantidades reducidas de factor VIIa existentes siempre en la sangre puede desencadenarse entonces la cascada enzimática. El punto final de esta cascada de coagulación es la enzima trombina, que se genera así a través de la vía extrínseca y común, y convierte fibrinógeno en fibrina. El fibrinógeno, que también puede usarse como proteína terapéutica, se escinde por parte de la trombina en monómero de fibrina y fibrinopéptidos. El monómero de fibrina se polimeriza para dar hebras de fibrina y finalmente para dar una red, que puede conducir en el lecho de la herida al cierre de una herida y por consiguiente a la finalización de una hemorragia. El fibrinógeno no es ni una enzima ni tiene
40 propiedades de cofactores (Lawson *et al.* 1994; Hemker 2002; Mann *et al.* 2002).

45 Sin embargo, la trombina no actúa sólo enzimáticamente sobre el fibrinógeno, sino que también convierte, entre otras, la proenzima factor de coagulación XIII en la enzima factor de coagulación XIIIa. Éste provoca como transglutaminasa mediante reticulaciones de las hebras de fibrina en la estructura principal de fibrina tridimensional una estabilidad biomecánica aumentada de la red de fibrina formada y también una protección frente a la degradación enzimática. En la sangre, o plasma, coagulada mediante la acción de la trombina se producen operaciones enzimáticas importantes adicionales, en particular la formación de trombina a partir de la proenzima protrombina, el factor de coagulación II. De este modo se produce un gran aumento de la concentración de trombina en la sangre coagulada, lo que provoca no sólo la conversión completa del factor de coagulación XIII en XIIIa, sino también la activación de la proenzima TAFI para dar enzima TAFIa. Esta enzima escinde de la fibrina un péptido
50 corto, que contienen receptores para un complejo enzimático fibrinolítico y sirve así para la resistencia de la fibrina frente a influencias fibrinolíticas. Para estas operaciones se requiere una concentración relativamente elevada de trombina en la sangre ya coagulada, que puede generarse mediante la activación de la protrombina presente en la sangre coagulada (Siebenlist *et al.* 2001).

La producción fuertemente aumentada de la trombina en el propio coágulo de sangre ya no se produce a través de la vía de tenasa extrínseca, sino a través de la vía de tenasa intrínseca y la común. Ya cantidades reducidas de trombina conducen en presencia de factor VIII y factor IXa y fosfolípido activo para la coagulación a la formación del complejo de tenasa intrínseca, que al igual que el complejo de tenasa extrínseca, pero con una intensidad 50 veces mayor, provoca la activación mediante escisión proteolítica del factor de coagulación X para dar Xa, que conduce entonces a la formación de trombina mediante la activación de la protrombina (Mutch *et al.* 2001).

En operaciones de coagulación fisiológicas así como en las fisiopatológicas, determinadas estructuras fosfolipídicas celulares provocan dentro de y en las células, en particular en las plaquetas, una fuerte aceleración adicional de determinadas operaciones enzimáticas en la cascada de coagulación, además de los cofactores de alto peso molecular que aumentan la actividad.

Estado de la técnica

Ya en los métodos hasta la fecha para la obtención de proteínas terapéuticas se han empleado condiciones de purificación, que pretendían minimizar las acciones de las enzimas sobre las proteínas que iban a obtenerse, realizándose por ejemplo la operación de purificación a temperaturas lo más bajas posible y/o mediante la inhibición de inhibidores (Kunicki *et al.* 1987 y 1992; Johnson *et al.* 1994 y 1996; Rotblat *et al.* 1985). A pesar de ello, este modo de proceder resultó ser insuficiente, en particular en el caso de proteínas que se someten a una ligera escisión enzimática. Igualmente, no se hizo un seguimiento cuantitativo suficiente de la eliminación de tales enzimas, sus proenzimas, cofactores y procotactores durante el procedimiento de purificación y por consiguiente tampoco se tuvo en cuenta de manera suficiente la formación posterior de tales enzimas durante todo el procedimiento de producción. Muchas de las proteínas terapéuticas obtenidas hasta la fecha se caracterizaban por este motivo sólo en un rendimiento insuficiente con una eficacia biológica modificada y reducida así como con una elevada inestabilidad, en particular durante el almacenamiento necesario del fármaco terminado.

Los inhibidores enzimáticos usados hasta la fecha en la purificación presentaban una concentración y/o aidez reducida. Por ello, enzimas, que ya estaban unidas a su sustrato, sólo podían neutralizarse de manera insuficiente. Además, tampoco se prestó atención a mantener la concentración de los inhibidores enzimáticos lo más constante posible durante la operación de purificación.

Las proteínas terapéuticas obtenidas mediante ingeniería genética pueden tener, ya durante su expresión y secreción desde células, enzimas proteolíticas unidas o unirse a aquéllas que están presentes en el medio de cultivo. Algo similar es aplicable también a las proteínas plasmáticas terapéuticas. En la obtención, el almacenamiento y el procesamiento de plasma puede formarse sobre todo enzimas proteolíticas, que reconocen las proteínas plasmáticas como su sustrato. De este modo se produce en primer lugar la formación de complejos proteasa-sustrato y posteriormente la escisión enzimática del sustrato.

Tras la formación de complejos de este tipo con una proteína terapéutica como sustrato de alto peso molecular, las proteasas ya no pueden inhibirse mediante inhibidores o sólo de manera mínima. Mediante estas operaciones, la calidad de las proteínas terapéuticas puede modificarse o destruirse en gran medida ya durante su producción y en particular durante el almacenamiento.

Ya durante la primera operación de fraccionamiento de la crioprecipitación de plasma pueden producirse modificaciones provocadas por las enzimas en el crioprecipitado y en el residuo de crioprecipitado, que conducen a un peor rendimiento y a una reducción de la calidad de las proteínas terapéuticas obtenidas posteriormente a la operación de producción. Esto es aplicable especialmente para el factor de coagulación VIII que puede obtenerse a partir del crioprecipitado. Operaciones enzimáticas en el crioprecipitado pueden conducir también a la activación del factor de coagulación XIII, que junto con la trombina es responsable de la formación con mayor frecuencia de complejos de monómero de fibrina. Los complejos de monómero de fibrina tienen un efecto desventajoso sobre la calidad del fibrinógeno que puede obtenerse a partir del crioprecipitado.

Del residuo de la crioprecipitación puede eluirse mediante la unión a intercambiadores aniónicos débiles y la elución con soluciones salinas una mezcla de factores de coagulación. Esta mezcla contiene esencialmente los factores de coagulación II, VII, IX y X y se denomina complejo de protrombina. También es posible aislar a partir del complejo de protrombina factores de coagulación individuales y procesar éstos adicionalmente para dar una preparación farmacéutica. El complejo de protrombina, procesado adicionalmente para dar una preparación farmacéutica, debe pasar por etapas de producción adicionales para garantizar una eliminación en gran medida de virus potencialmente presentes. Estas etapas de producción deben realizarse a temperatura ambiente o a temperatura ambiente aumentada. Condicionado por el material de partida así como por la producción, existe la posibilidad de que se activen factores de coagulación presentes en el complejo de protrombina, que en el caso de la aplicación parenteral del complejo de protrombina son al menos copartícipes en efectos secundarios de este producto, que pueden manifestarse en obstrucciones vasculares periféricas, infartos de miocardio, embolias pulmonares o apoplejías. Por tanto, el objetivo es obtener los factores de coagulación contenidos en el complejo de protrombina de tal manera que no se activen durante el almacenamiento ni durante la operación de producción ni durante el uso posterior.

También en la obtención de trombina, plasminógeno e inmunoglobulinas, que se obtienen de diferentes fracciones

del residuo de crioprecipitación, las activaciones de zimógenos desempeñan un papel desventajoso.

Así, la trombina puede estar contaminada con plasmina, que se genera a partir de su zimógeno, plasminógeno, y presentar de ese modo un efecto hemostático insuficiente. De manera correspondiente al contenido en plasmina se produce una disolución prematura del cierre de la herida y la nueva aparición de hemorragias.

- 5 También en la obtención de inmunoglobulinas, las activaciones de zimógenos desempeñan un papel importante. Así, la inmunoglobulina G se escinde mediante la plasmina en un fragmento Fab y un fragmento Fc. Esta escisión enzimática de la inmunoglobulina conduce en caso de una aplicación parenteral de la inmunoglobulina G a una semivida muy reducida y a una reducción de la calidad de los anticuerpos contenidos en la preparación de inmunoglobulina. Para fines terapéuticos, a menudo es necesario administrar grandes cantidades de
- 10 inmunoglobulina G (hasta 250 g por paciente). A este respecto, se notificaron repetidas veces efectos secundarios graves, tales como infartos de miocardio y obstrucciones vasculares centrales. Por tanto, resulta de gran interés producir preparaciones de inmunoglobulina, que no contengan procoagulantes.

- 15 Por la acción de proteasas pueden producirse también a menudo formación de agregados homoméricos y heteroméricos, que repercute en la formación de partículas visibles en forma de agregados insolubles, aumentos de la viscosidad, ralentización de las etapas de filtración necesarias, disminución del rendimiento y estabilidad insatisfactoria durante el almacenamiento de los productos intermedios y terminados.

Planteamiento del objetivo

- 20 El planteamiento del objetivo resulta de la necesidad de reducir lo máximo posible la formación de proteasas y su acción sobre proteínas terapéuticas durante su producción y almacenamiento, para evitar rendimientos insatisfactorios en los procedimientos de purificación necesarios así como disminuciones de calidad debido a modificaciones de su estructura molecular provocadas por operaciones enzimáticas. Por tanto, es necesario emplear procedimientos de producción que permitan una obtención y un tratamiento del material de partida, sin que se produzcan modificaciones provocadas por enzimas de proteínas terapéuticas durante el procedimiento de purificación necesario, inclusive la eliminación de virus.

- 25 Por consiguiente es necesario que en la producción y el almacenamiento de proteínas terapéuticas éstas estén protegidas por la correspondiente eliminación y/o la adición de inhibidores enzimáticos frente a todas las acciones directas de enzimas, que las reconocen como sustratos, así como de las acciones indirectas por proenzimas, cofactores y procofactores.

- 30 También es necesario determinar aquellas concentraciones de enzima que todavía no conducen a una modificación de una determinada proteína terapéutica, teniendo en cuenta el tiempo de acción y las demás condiciones importantes para la actividad enzimática.

- 35 Para la estabilidad de las proteínas terapéuticas es necesaria la medición de actividades enzimáticas a lo largo de largos periodos de tiempo, para poder sacar conclusiones del estudio acelerado de la estabilidad con respecto a la estabilidad a largo plazo. Tales estudios acelerados de estabilidad se prolongan en la mayoría de los casos durante un periodo de tiempo de al menos un mes.

Dado que ya cantidades de enzima muy reducidas pueden conducir a modificaciones de proteínas terapéuticas, es necesario el desarrollo de métodos de determinación correspondientes que se prolonguen a lo largo de periodos de tiempo más largos.

- 40 También es importante la medición de la cantidad de inhibidor necesaria para inhibir las proteasas que no puedan eliminarse y mantener esta inhibición a largo plazo.

Solución del objetivo

- 45 Por consiguiente, la invención se refiere a fármacos almacenables, producidos a partir de preparaciones de principio activo farmacéutico, seguras frente a virus, que contienen fibrinógeno como sustancia farmacéutica activa, no estando presentes en las preparaciones de principio activo enzimas activas libres ni unidas todavía a sus sustratos, en particular proteasas, en concentraciones que reduzcan la seguridad o la eficacia del fibrinógeno.

A ser posible, el fibrinógeno no debe contener ninguna proenzima que pueda activarse para dar enzimas que reconozcan al fibrinógeno como sustrato, ni tampoco cofactores ni procofactores que fomenten esta activación.

- 50 Por tanto, la solución del planteamiento del objetivo se consigue mediante condiciones de producción y de almacenamiento mantenidas de manera consecuente, en las que se impide lo máximo posible la acción de una enzima o varias enzimas sobre el fibrinógeno, que es su sustrato, al igual que la formación de tales enzimas a partir de sus correspondientes proenzimas.

Para impedir modificaciones provocadas por enzimas en los materiales de partida, productos intermedios y productos terminados, es necesario determinar actividades mínimas de proteasas, que no conduzcan todavía a una modificación del fibrinógeno. Para ello son necesarios métodos de determinación que puedan detectar todavía

trazas de enzimas. En el ejemplo 1 de la determinación ultrasensible de trombina se muestra que mediante la incubación a largo plazo con sustratos cromogénicos todavía pueden determinarse cantidades de trombina de entre 30 y 100 $\mu\text{E}/\text{mililitro}$. Esto corresponde a una disolución de trombina 300 - 1000 picomolar y a una cantidad de desde 300 hasta 1000 alomoles/ml.

5 El control de una determinada actividad enzimática se realiza de tal manera que se selecciona un sustrato de bajo peso molecular, sensible, para la proteasa que va a determinarse y durante todo el procedimiento de producción se somete una muestra paralela a las mismas condiciones de producción y se mide la escisión enzimática del sustrato en esta muestra. Los sustratos de bajo peso molecular usados en las muestras paralelas deben presentar una estabilidad lo más alta posible, para que puedan usarse en estudios a largo plazo. Deben seleccionarse sustratos cromogénicos o fluorogénicos adecuados, que se escindan al máximo por la proteasa que va a estudiarse. Las cantidades de un sustrato escindido, que se generan en la producción, el almacenamiento intermedio y el almacenamiento de una proteína terapéutica, pueden determinarse en equivalentes en katalas y relacionarse con el peso o la actividad de una proteína terapéutica. Véase el ejemplo 9.

15 Se describen además procedimientos de purificación para la obtención de proteínas terapéuticas a partir de sangre o biomasa. Los materiales auxiliares necesarios para ello pueden eliminarse al final del procedimiento de producción total o parcialmente de los principios activos obtenidos. El procedimiento de producción se dirige con ayuda de la inactivación en gran medida de las actividades proteasa, de tal manera que puede obtenerse al menos el 60%, preferiblemente el 95%, de la respectiva proteína terapéutica, con respecto al material de partida.

20 Pueden utilizarse también sustancias caotrópicas atóxicas adicionales, que disocian una unión enzima-sustrato o no dejan que se produzca una unión de este tipo y de este modo mejoran la separación de enzimas unidas a proteínas terapéuticas, en particular proteasas, eliminándose de nuevo las sustancias caotrópicas tras el procedimiento de separación.

25 Mediante el mantenimiento consecuente de temperaturas bajas de entre 0°C y 4°C, la unión de complejos de iones calcio, el empleo de determinadas sustancias inorgánicas y orgánicas así como agentes caotrópicos, el ajuste de potenciales redox y el empleo de inhibidores enzimáticos disueltos o inmovilizados adecuados se mantienen las actividades enzimáticas lo más bajas posible. En caso de usar inhibidores enzimáticos de alto peso molecular solubles debe garantizarse que sean atóxicos y seguros frente a virus y que en las concentraciones usadas no influyan en la acción de las proteínas terapéuticas. Véase el ejemplo 10.

30 Las actividades residuales aún existentes de las enzimas se miden durante toda la operación de producción en muestras de todos los productos intermedios mediante la adición de sustratos de bajo peso molecular sensibles para las enzimas individuales de las que deba hacerse un seguimiento. Cuando en una determinada etapa intermedia la actividad enzimática supere los límites mínimos establecidos, se aumenta inmediatamente la concentración del inhibidor usado, o de los inhibidores usados. Véase el ejemplo 13.

35 En las etapas de producción en las que las actividades enzimáticas aún presentes resultan molestas, se añaden inhibidores enzimáticos disueltos o inmovilizados adecuados en la medida necesaria. Los inhibidores alogénicos disueltos se eliminan o se usan junto con la proteína terapéutica como principio activo.

40 En la producción de proteínas terapéuticas es necesario realizar inactivaciones de virus y eliminaciones de virus, que en la mayoría de los casos deben llevarse a cabo a temperatura ambiente o temperaturas un poco por encima. Los productos químicos viricidas se separan tras la finalización del procedimiento de inactivación de virus de nuevo de las proteínas terapéuticas. La eliminación de virus de proteínas terapéuticas puede llevarse a cabo por ejemplo mediante nanofiltración a temperaturas de entre 20°C y 40°C usando nanofiltros con un diámetro de poro de 75 nm y 35 nm. Para llegar a una eliminación segura de todos los virus, es necesario emplear un filtro poroso de 20 nm y a continuación un filtro poroso de 15 nm. Dado que estas etapas de procedimiento se llevan a cabo a entre 20°C y 40°C deben reducirse de manera correspondiente las actividades enzimáticas no deseadas mediante la adición de inhibidores adecuados. Véase el ejemplo 10.

45 Las diferentes actividades proteolíticas aumentan mucho en caso de almacenamiento de plasma con citrato a pesar de temperaturas de almacenamiento bajas a -20°C. Tales actividades enzimáticas muy aumentadas pueden determinarse también en el crioprecipitado y el residuo de crioprecipitado producidos a partir de este plasma, tal como se muestra en el ejemplo 1. Mediante la adición de EDTA a plasma con citrato recién obtenido puede suprimirse casi completamente la actividad de iones calcio, que se mide con un electrodo de calcio. Mediante esta adición, en caso de almacenamiento del plasma en estado ultracongelado, puede suprimirse la formación de enzimas proteolíticas. Durante el almacenamiento de pasta de crioprecipitado en estado ultracongelado, que se produce a partir de plasma recién obtenido, se produce la activación de proteasas. La formación de enzimas proteolíticas puede impedirse mediante la adición de EDTA antes de la congelación del crioprecipitado. En caso de un tratamiento inmediato de un residuo de crioprecipitado no es necesaria una adición adicional de EDTA. En caso de un almacenamiento deseado del residuo de crioprecipitado en estado ultracongelado, mediante la adición de cantidades reducidas de heparina antes de la congelación puede impedirse la formación de proteasas. Véase el ejemplo 1.

La invención se refiere por tanto a un fibrinógeno seguro frente a virus como sustancia farmacéutica activa en fármacos, que se caracteriza porque presenta menos del 4% de complejos de monómero de fibrina, con respecto a la proteína total (fibrinógeno y complejos de monómero de fibrina), y menos de 1 μ U de trombina por mg de fibrinógeno. Véase el ejemplo 2.

- 5 También es según la invención un fármaco que contiene fibrinógeno, que puede almacenarse en estado líquido a la temperatura de frigorífico, que se caracteriza porque contiene una actividad trombina de menos de 1 μ U de trombina por mg de fibrinógeno y arginina como agente caotrópico en una concentración de desde el 0,5% hasta el 5,0%. Cuando el fibrinógeno se produce a partir de plasma, que se almacenó más tiempo a -20°C , entonces puede contener un 5% o más de complejos de monómero de fibrina. Esto conduce en el almacenamiento en frigorífico a una gelificación. Según el contenido en complejos de monómero de fibrina esta gelificación puede impedirse mediante la adición de agentes caotrópicos, por ejemplo mediante arginina. Véase el ejemplo 3.

- 10 La trombina se usa como tal o junto con fibrinógeno para la interrupción de hemorragias, dado que empleada en una concentración suficiente, conduce inmediatamente a la configuración de un tapón hemostático. Las preparaciones de trombina pueden estar contaminadas con plasmina, y si bien tales preparaciones conducen igualmente, junto con fibrinógeno, a la configuración de un tapón hemostático, sin embargo éste se disuelve debido a la presencia de plasmina de una manera más o menos rápida, por lo que la hemorragia interrumpida podría empezar de nuevo. Como se muestra en el ejemplo 4, mediante la eliminación de plasminógeno y plasmina, se consigue producir una preparación de trombina, que está libre de propiedades fibrinolíticas.

- 15 La inmunoglobulina G, que puede almacenarse como preparación farmacéutica terminada tanto ultracongelada como líquida, se utiliza esencialmente para subsanar una deficiencia de anticuerpos en pacientes con síndrome de deficiencia de anticuerpos, y últimamente en diferentes enfermedades inflamatorias graves, en particular en neurología. La dosificación en tales enfermedades inflamatorias puede ascender hasta diez veces más que la cantidad usada en deficiencias inmunológicas. En este tratamiento de dosis alta con inmunoglobulina G pueden aparecer efectos secundarios, que se producen mediante obstrucciones vasculares periféricas, coronarias o cerebrales. Por este motivo, las preparaciones de inmunoglobulina deben estar libres en la mayor medida posible de procoagulantes. Las preparaciones de inmunoglobulina están contaminadas en general con factores de la fase de contacto, tales como caliceína y factor de coagulación XI activado. Mediante la adición de inhibidor C_1 y heparina pueden reducirse en gran medida estas actividades enzimáticas, o hacerse que ya no sean detectables. Véase el ejemplo 5.

- 20 Además, mediante la acción de proteasas, particularmente plasmina, sobre inmunoglobulinas puede producirse la escisión en el fragmento Fab y el fragmento Fc. A este respecto, se produce una fuerte reducción de la eficacia biológica, al disminuir mucho temporalmente la biodisponibilidad y reduciéndose la calidad de los anticuerpos contenidos en la preparación de inmunoglobulina G. La plasmina se forma a partir del plasminógeno contenido en la mayoría de las preparaciones de inmunoglobulina durante la producción y el almacenamiento del producto. Mediante la adición de inhibidores disueltos o inmovilizados, tales como aprotinina, pueden impedirse tanto la formación de plasmina como la acción de plasmina.

Mediante la precipitación repetida de sales en presencia de urea es posible eliminar las actividades fibrinolíticas en tal medida que en caso de precipitaciones repetidas ya no pueda detectarse en la preparación de inmunoglobulina ninguna fibrinolisis. Véase el ejemplo 5.

- 30 El complejo de protrombina está compuesto por cuatro zimógenos, los factores de coagulación II, VII, IX y X. Su formación en el organismo depende de la vitamina K. Mediante antagonistas de vitamina K, tal como por ejemplo la warfarina, puede reducirse la formación de estos factores de coagulación en función de la dosis, con lo que se posibilita un tratamiento con anticoagulante oral en la intensidad deseada. Este tratamiento es necesario para impedir las amenazadoras obstrucciones vasculares. Mediante la administración parenteral de complejo de protrombina puede interrumpirse inmediatamente, en caso necesario, el tratamiento con anticoagulante oral. Igualmente, en pacientes cuya enfermedad primaria conduce a una deficiencia de complejo de protrombina, mediante la administración parenteral de complejo de protrombina puede neutralizarse inmediatamente una tendencia a la hemorragia.

- 35 En el caso del tratamiento parenteral con preparaciones de complejo de protrombina aparecen en ocasiones efectos secundarios graves por obstrucciones vasculares, que están provocadas por la formación de trombos. Tales obstrucciones vasculares se atribuyen a factores de coagulación activados, que pueden estar contenidos en complejos de protrombina. La activación de los factores de coagulación contenidos en el complejo de protrombina tiene lugar mediante el factor de coagulación Xa activado, que conduce a la formación de trombina a partir de protrombina y a continuación a la formación de fibrina a partir de fibrinógeno. La activación de factor Xa puede tener lugar tanto a través de la vía de tenasa extrínseca, que depende del factor de coagulación VIIa, como además en mayor medida a través de la vía de tenasa intrínseca, que depende de los factores de coagulación IX y VIII activados.

La formación de factor Xa se consigue a través de la vía de tenasa intrínseca mediante la eliminación completa de los factores de coagulación VIII y VIIIa del complejo de protrombina. Manteniendo un contenido lo más alto posible

de TFPI plasmático en la preparación de complejo de protrombina se impide la formación de factor Xa a través de la vía de tenasa extrínseca. Véase el ejemplo 7.

5 Tal como se muestra en el ejemplo 9, es posible detectar y determinar enzimas proteolíticas en concentraciones extremadamente reducidas, prolongando los tiempos de incubación de la enzima con sustrato cromogénico en de 100 a 1000 veces. Mediante la elección de sustratos cromogénicos estables se consigue detectar y determinar la acción de proteasas también a temperaturas bajas cercanas al punto de congelación, empleándose tiempos de incubación de 1000 a 10000 veces mayores con respecto al tiempo de incubación normal de tres minutos. Esta escisión de sustratos cromogénicos durante mucho tiempo tampoco se reduce en presencia de los sustratos de alto peso naturales de las enzimas.

10 Los productos de reacción enzimáticos, que pueden producirse por las enzimas en concentraciones de micro a femtomolares, pueden detectarse o determinarse en proteínas terapéuticas producidas según la invención mediante espectrometría de masas, HPLC, filtración en gel y métodos cromatográficos, electroforéticos o inmunológicos. Véase el ejemplo 12.

15 Las actividades enzimáticas pueden determinarse en muestras para el control del procedimiento, manteniendo durante todo el procedimiento de producción una concentración de sustrato cromogénico seleccionado, en caso necesario mediante la adición complementaria de sustrato cromogénico. El sustrato cromogénico escindido enzimáticamente se determina como la diferencia entre el sustrato cromogénico escindido en total y el sustrato en los controles correspondientes. En caso de usar sustratos cromogénicos que contienen p-nitroanilina, con ayuda de una curva de calibración de p-nitroanilina puede determinarse la cantidad absoluta del sustrato cromogénico escindido.

20 Para alcanzar condiciones de almacenamiento óptimas para fármacos que contienen proteínas terapéuticas, puede ser necesaria la adición de inhibidores enzimáticos en la formulación del fármaco. Durante el empleo de tales fármacos, que se prolonga a lo largo de varias horas, el fármaco líquido debe tener una estabilidad suficientemente elevada a temperatura ambiente. En caso de un consumo sólo parcial y conservación del fármaco no consumido en el frigorífico debe garantizarse una estabilidad a lo largo de aproximadamente tres días a la temperatura del frigorífico. Véase el ejemplo 8.

Mediante los siguientes ejemplos se explican más detalladamente configuraciones preferidas de la invención.

Ejemplos:

30 1. Obtención de material de partida pobre en proteasa y fracciones brutas producidas a partir del mismo para la producción de proteínas terapéuticas:

A. Plasma pobre en proteasa:

35 Se mezcla plasma con citrato recién preparado con un contenido de no más de 300 μ U de trombina por ml con tanta cantidad de una disolución de EDTA al 1%, que la actividad de iones calcio no ascienda a más que la actividad iónica de una disolución de cloruro de calcio 10 μ M. Se realizaron mediciones con un electrodo de calcio tipo 15 220 3000 de la empresa Mettler Toledo. Se hizo una lectura de la tensión de la cadena de medición en mV y se creó una curva de calibración en el intervalo de medición superior e inferior a 25°C. La unión al complejo de iones calcio mediante EDTA se mide en caso de adición de EDTA mediante la reducción de la tensión de la cadena de medición. Ya no se tuvieron en cuenta las tensiones de la cadena de medición que se encontraban por debajo de -15 mV. Como intervalo de medición inferior ya no se tuvieron en cuenta tensiones de la cadena de medición que corresponden a una disolución de cloruro de calcio 5 - 10 μ M. También se congela el plasma mezclado con disolución de EDTA, se determina la actividad de iones calcio en muestras descongeladas a intervalos de 30 días e igualmente la actividad trombina y de tipo trombina con sustrato cromogénico S-2238. En el plasma mezclado con EDTA no se produce ningún aumento significativo de la actividad enzimática, mientras que en el plasma con citrato almacenado, que no se mezcló con EDTA, aumenta adicionalmente la actividad enzimática de trombina y de tipo trombina y tras tres meses de almacenamiento a -20°C asciende a 5-10 veces el valor de partida.

45 El plasma recién preparado, mezclado con EDTA, hasta que se alcanza una tensión de la cadena de medición de 15 mV, no presenta en el caso de un almacenamiento de tres meses a -20°C más de 1000 μ U de trombina por ml. La determinación de la actividad trombina tiene lugar con sustrato cromogénico S-2238, midiéndose en ese caso actividades enzimáticas tanto de trombina como de tipo trombina y expresándose en unidades de trombina.

50 B. Crioprecipitado pobre en proteasa, almacenado:

55 A partir del plasma mezclado con EDTA, que se almacena ultracongelado, al descongelar a una temperatura que no supera los 5°C puede obtenerse un depósito generado a este respecto, el crioprecipitado, mediante centrifugación entre 10000 y 20000 U/min. El sedimento se remueve mediante la adición de una disolución de citrato al 0,1% para dar un pasta ligeramente líquida, debiendo ascender la

temperatura a entre 2°C y 4°C, y puede usarse en esta forma para la producción adicional de fibrinógeno, factor VIII, factor V y factor XIII. En caso de que se desee un almacenamiento, a esta suspensión pastosa se le añade con agitación una disolución de EDTA al 1% hasta que una muestra obtenida de la misma, diluida con agua destilada 10 veces, corresponda a la actividad de iones calcio de una disolución de cloruro de calcio 10 µM. Entonces se congela la suspensión pastosa que contiene EDTA así obtenida y se almacena a -20°C o temperaturas inferiores. Tras descongelar de nuevo la suspensión de crioprecipitado en el plazo de tres meses, la actividad trombina medida con sustrato cromogénico S-2238 asciende en una disolución, que no contiene más de 3 mg de fibrinógeno por ml, a 1000 µU de trombina por ml.

C. Residuo de crioprecipitado pobre en proteasa:

El residuo obtenido tras la separación por centrifugación del crioprecipitado puede procesarse adicionalmente de manera inmediata como tal. En caso de prever almacenamiento en estado ultracongelado se minimizan las actividades proteasa presentes mediante la adición de 1 U de heparina por ml de residuo de crioprecipitado. Para un tiempo de almacenamiento intencionado de seis meses en estado ultracongelado el residuo de crioprecipitado mezclado con heparina no puede contener por ml más de 1 ng de factor XIa, 100 U de calicreína, 1 mU de factor Xa, 10 mU de trombina y 100 mU de plasmina.

2. Producción de fibrinógeno libre de trombina:

Aproximadamente 650 g de pasta de crioprecipitado, que se obtuvo a partir de 100 l de plasma sanguíneo humano, se disuelven en 10 l de una disolución de citrato de sodio al 0,1% a una temperatura de desde 2° hasta 4°C manteniendo un valor de pH de entre 7,0 y 7,5 con agitación durante una hora. La disolución del crioprecipitado no tiene lugar de manera completa. Tras la toma de una muestra se determina el peso total de la disolución y se congela toda la disolución y se almacena a -20°C.

En la muestra extraída se determina el contenido en fibrinógeno y fibrinopéptido A. También se mide la actividad trombina con ayuda de sustrato cromogénico S-2238 a 4°C y a 37°C. Se determina el contenido en fibrinógeno nefelométricamente y se determina cuantitativamente el contenido en fibrinopéptido A con ayuda de un método Elisa.

Tras la descongelación de la cantidad principal, en caso de que la determinación de trombina a 37°C haya dado como resultado una actividad trombina de más de 10 µU de trombina/ml de fibrinógeno, se añade una cantidad calculada de r-hirudina (lepirudina), que resulta de la cantidad de r-hirudina medida en un ensayo previo, que es necesaria para llevar la actividad trombina a por encima de o por debajo de 10 µU de trombina/mg de fibrinógeno. Se mezcla la disolución de crioprecipitado descongelada a una temperatura, que no supera los 5°C, con 150 g de glicina por kg de disolución de crioprecipitado y se agita durante 30 minutos. El fibrinógeno precipitado a este respecto se separa tras un almacenamiento de 12 a 24 horas a entre 2°C y 4°C mediante centrifugación en una centrífuga Sharples. El tiempo de paso se ajusta de modo que se obtenga un residuo claro, sin precipitado. El residuo puede congelarse para su procesamiento adicional y almacenarse a -20°C. En una muestra del residuo se determina todavía fibrinógeno presente, fibrinopéptido A, actividad trombina e inhibición de la actividad trombina.

El sedimento obtenido mediante la deposición de glicina y la centrifugación se disuelve en un tampón citrato al 0,1% de pH 7,0 a 7,5, se determina nefelométricamente el contenido en fibrinógeno y mediante la adición de tampón citrato adicional se ajusta a una concentración de fibrinógeno deseada de entre el 1% y el 2%. La disolución en tampón citrato se lleva a cabo a una temperatura de desde 2°C hasta 4°C, al igual que la posterior centrifugación del depósito de glicina disuelto a de 10000 a 15000 revoluciones por minuto y una duración de centrifugación de al menos 10 minutos. Se desecha el sedimento obtenido mediante la centrifugación y se mezcla el residuo con 1/10 de la cantidad de r-hirudina añadida originariamente y mediante la adición de glicina sólida se ajusta a una concentración de glicina del 15%. El valor de pH de la suspensión no debe estar por debajo de 6,5 y no debe encontrarse por encima de 7,5. Se realizan las correcciones necesarias del valor de pH con una disolución de ácido cítrico al 1% o una solución cáustica al 0,1%. Se centrifuga el precipitado tras un reposo de 12 a 24 horas a de 2°C a 4°C y se disuelve el sedimento de fibrinógeno obtenido en disolución de citrato al 0,1% a un valor de pH de desde 7,0 hasta 7,5. En caso de que la disolución contenga más de 1 µU de trombina por mg de fibrinógeno, se añade r-hirudina adicional, para llevar la actividad trombina por debajo de 1 µU de trombina por mg de fibrinógeno. La reprecipitación del fibrinógeno con glicina y la adición en todo caso necesaria de r-hirudina pueden repetirse también múltiples veces, para conseguir una purificación suficiente del fibrinógeno.

Hay un fibrinógeno suficientemente purificado cuando al menos el 95% de la proteína presente se coagula por adición de trombina, el pico de fibrinógeno en la filtración en gel con Superose 6HR 10/30, Amersham, asciende al menos al 94% y al aplicar 10 µg de fibrinógeno en la electroforesis en gel-SDS hay un producto de bandas puras. Además, en caso de usar un tampón reductor no puede aparecer ninguna banda de fibrinógeno y deben aparecer tres bandas de las cadenas de fibrinógeno correspondientes.

La disolución de fibrinógeno así obtenida puede liberarse del agente de precipitación en exceso mediante diafiltración frente a citrato al 0,1%, al igual que de fosfato de trinitrobutilo y Tween-80 tras haber tenido lugar la inactivación de virus. Dado que la diafiltración así como la inactivación de virus se realizan con disolvente/detergente

y una nanofiltración en todo caso posterior a temperatura ambiente, en todo caso es necesario añadir todavía cantidades adicionales de r-hirudina para no dejar que la actividad trombina durante estas etapas de producción aumenten por encima de 1 μ U de trombina por mg de fibrinógeno.

5 La disolución de fibrinógeno inactivada con respecto a virus y a la que se le han eliminado virus puede almacenarse ultracongelada o liofilizada hasta su procesamiento adicional. Tras la descongelación o reconstitución del fibrinógeno liofilizado en un disolvente adecuado puede llevarse a cabo la formulación, filtración estéril, distribución en porciones y llenado en unidades de consumidor final. El fármaco terminado así producido puede almacenarse en estado tanto líquido o congelado como liofilizado.

10 La integridad del fibrinógeno así obtenido y procesado para dar un fármaco terminado se determina mediante la cantidad formada durante toda la producción y el almacenamiento de fibrinopéptido A. La cantidad total del fibrinopéptido A, con respecto a la cantidad de partida total de fibrinógeno, no puede ascender a más del 10%, y debe ascender preferiblemente al 5%.

3. Producción de disoluciones que contienen fibrinógeno, que a temperaturas de entre 0°C y 5°C no conduce a gelificación:

15 El fibrinógeno, producido según métodos convencionales, contiene entre el 5% y el 15% de complejos de monómero de fibrina. La determinación precisa de los complejos de monómero de fibrina tiene lugar con ayuda de la filtración en gel y según la invención mediante una adición de un 5% de urea a la disolución que contiene fibrinógeno que va a estudiarse. Mediante el efecto caotrópico de la urea se provoca una buena separación de los complejos de monómero de fibrina y la fibrina.

20 Se mezcla una disolución de fibrinógeno, que contiene entre el 1% y el 10% de fibrinógeno, con diferentes cantidades de arginina sólida, de modo que se generan disoluciones de fibrinógeno, que contienen el 0,5%, el 1%, el 2%, el 4% y el 8% de arginina. Como control se lleva conjuntamente una disolución de fibrinógeno sin adición de arginina. Las disoluciones de arginina y el control se mantienen al menos 15 minutos a temperatura ambiente y entonces se llevan hasta una temperatura de entre 0°C y 5°C. Tras una incubación de hasta 24 horas se determina la cantidad de arginina que debe añadirse para impedir una gelificación.

25 Por tanto, este modo de proceder se usa tanto para la producción de una preparación de principio activo, que contiene fibrinógeno como proteína terapéutica, como en la formulación de fármacos que contienen fibrinógeno, en particular que se almacenan en estado líquido. Sin embargo, la cantidad de arginina determinada también puede añadirse antes de la ultracongelación de fármacos que contienen fibrinógeno, para evitar una gelificación tras la descongelación o reconstitución con disolventes en caso de almacenamiento en el frigorífico.

30 Ejemplos 4 – 7 no según la invención:

4. Obtención de disoluciones de trombina libres de fibrinolisis:

35 La trombina, producida según cualquier método mediante activación de protrombina, se absorbe múltiples veces (al menos cinco veces) en CM-Sepharose y se eluye con un gradiente de cloruro de sodio, que está tamponado con una disolución de fosfato 10 mM, pH 7,0, hasta una disolución de cloruro de sodio de entre 120 y 180 mM. Antes de la elución se lava cinco veces la CM-Sepharose que contiene trombina con 10 veces su volumen, usándose una disolución de lavado con un contenido en fosfato de sodio 10 mM y un contenido en cloruro de sodio 50 mM a pH 7,5 y se realiza la operación de lavado a entre 2°C y 4°C.

40 La trombina eluida con cloruro de sodio entre 120 y 180 M se estudia para determinar su contenido en plasmina y plasminógeno que puede activarse con t-PA. El estudio tiene lugar en la prueba de fibrinolisis. Se mezclan 100 μ l del eluato, que se ajustó a aproximadamente 100 U de trombina por ml, con 50 μ l de una disolución de cloruro de calcio 0,025 molar y 100 μ l de una disolución de fibrinógeno libre de plasminógeno al 1%. Se lleva esta mezcla básica a una cubeta para la coagulación y se observa que se produce una lisis con un lector de Elisa Sunrise TECAN a lo largo de 18 horas. Se estudia al mismo tiempo una mezcla básica simultánea, que contiene además 10 mU de t-PA, para determinar el tiempo de lisis. La disolución de trombina que va a estudiarse no puede provocar una lisis en ambas mezclas básicas tras 18 horas.

Si se observa una lisis, debe realizarse la purificación descrita de trombina en CM-Sepharose hasta que en la prueba de fibrinolisis no se observe una lisis de la mezcla básica hasta durante 18 horas.

5. Producción de preparaciones de inmunoglobulina G estables, no nocivas, funcional y estructuralmente intactas:

50 La fracción II de Cohn, tras la eliminación del alcohol mediante liofilización o diafiltración, se lleva mediante dilución en agua destilada hasta un contenido del 1-2% de proteína. Se mezcla esta disolución con \leq 50 g de urea por l, se ajusta con solución cáustica al 0,1% a pH 8 y se añade sulfato de sodio hasta que se genera una disolución saturada de sulfato de sodio. En la disolución de sulfato de sodio que contiene precipitado se elimina mediante decantación el eventual exceso no disuelto de sulfato de sodio y se obtiene la inmunoglobulina precipitada mediante centrifugación con ayuda de una centrífuga continua. Durante toda la operación el valor de pH debe encontrarse

entre 7,5 y 8,0. El depósito de inmunoglobulina obtenido mediante la saturación de sulfato de sodio se disuelve tras la centrifugación en agua destilada, usándose aquella cantidad de agua que dé como resultado una disolución de inmunoglobulina a aproximadamente el 5%. Se estudia esta disolución de inmunoglobulina para determinar su contenido en plasmina y plasminógeno que puede activarse mediante tPA o urocinasa. Con este fin, se mezclan 500 μ l de esta disolución con 10 U de tPA o urocinasa en un volumen de 50 μ l y se añaden 50 μ l de estimulador, que contiene un 1% de fibrinopéptidos. Tras la adición de 100 μ l de una disolución de sustrato cromogénico S-2403 4 mM se incuba la mezcla básica a 37°C y se determina fotométricamente la cantidad de p-nitroanilina. Con ayuda del ΔA obtenido se determina en una curva de calibración convencional el contenido en unidades de plasmina, que no puede ser mayor de 0,1 U por ml de una disolución de inmunoglobulina al 5%. Esta cantidad así determinada se compone de las cantidades de plasmina ya presentes así como aquellas que se formaron por los activadores de plasminógeno.

La disolución de inmunoglobulina diafiltrada tampoco puede contener más de 10 U de caliceína y no más de 1 ng de factor de coagulación XIa, con respecto a una disolución de inmunoglobulina al 5%. El contenido en caliceína se determina con el sustrato cromogénico S-2302 y el contenido en factor XIa con el sustrato cromogénico S-2366.

Para descartar acciones procoagulantes de la preparación de inmunoglobulina G obtenida, se establece si se produce un acortamiento del tiempo de coagulación de un plasma con citrato recalificado. Con este fin se mezclan bien 100 μ l de plasma con citrato con 100 μ l de la preparación de inmunoglobulina que va a estudiarse con un contenido en proteína del 5% y se añaden 100 μ l de una disolución de cloruro de calcio 25 mM y se mide el tiempo de coagulación a 37°C. Como control sirve una mezcla básica de 100 μ l de plasma con citrato con 100 μ l de tampón, al que tras un buen mezclado se le añaden 100 μ l de una disolución de cloruro de calcio mM y de la misma manera se determina el tiempo de coagulación. Los tiempos de coagulación medidos en función del plasma con citrato usado deben encontrarse entre 300 y 500 segundos. El acortamiento del tiempo de coagulación por una inmunoglobulina al 5% debe ascender a menos del 10%.

6. Producción de concentrado de factor VIII libre de factor VIIIa:

Una muestra ultracongelada del residuo almacenado ultracongelado del precipitado de glicina al 15% del crioprecipitado disuelto se estudia tras la descongelación con ayuda del kit Faktor VIII Chromogen, DADE Behring, para determinar toda la actividad presente de factor VIII, que se compone del factor VIII y VIIIa presente. La determinación se realiza con y sin adición de la trombina presente en el kit. La diferencia que resulta de ambas determinaciones, se califica como la cantidad de factor VIII, que puede transformarse en factor VIIIa mediante la trombina.

En la muestra se determina también la cantidad del inhibidor de trombina presente en unidades arbitrarias de inhibidor. En caso de que en la muestra estudiada estén presentes menos de 10 unidades arbitrarias de inhibidor por U de factor VIII, se aumenta de manera correspondiente el contenido en inhibidor mediante la adición de r-hirudina.

Se liberan en gran medida de glicina 5 ml de la muestra mediante ultrafiltración con ayuda de un filtro de 30 K o 50 K Dalton y lavado con un tampón fosfato 25 mM pH 7,3, que contiene citrato al 0,1%, y se estudia el retenido para determinar los productos de escisión de factor VIII. Mediante la separación electroforética de las proteínas en un gel de acrilamida al 5% y en un gel de separación al 10% se estudian las bandas de proteína sometidas a transferencia con ayuda de un anticuerpo mononuclear frente a la cadena pesada del factor VIII para determinar en todo caso los productos de escisión presentes.

Se mezcla la cantidad principal congelada del residuo de glicina del ejemplo 2 con agitación a de 2°C a 4°C por kg de residuo con 350 g de β -alanina. El depósito, que contiene la cantidad principal del factor VIII, se obtiene tras de 12 a 24 horas de reposo a de 2°C a 4°C mediante centrifugación a un número de revoluciones de entre 10000 y 15000 revoluciones por minuto, seleccionándose la velocidad de paso de tal manera que se obtiene como resultado un residuo claro. Se disuelve el sedimento que contiene factor VIII en una cantidad de tampón citrato al 0,1% de pH 7,5, de modo que por ml se obtiene como resultado un contenido en factor VIII de entre 50 y 500 U. Toda la operación se realiza a una temperatura de entre 2°C y 4°C. Tras la medición de la cantidad de inhibidor de trombina, en caso de que sea necesario, mediante la adición de r-hirudina se ajusta la proporción de factor VIII con respecto a inhibidor a 10 unidades arbitrarias de inhibidor de trombina por 1 U de factor VIII. Entonces se libera en gran medida de glicina y β -alanina la disolución a temperatura ambiente mediante diafiltración frente a una disolución de citrato al 0,1% con un valor de pH de desde 7,0 hasta 7,5, pudiendo purificarse adicionalmente antes de la diafiltración mediante una o dos reprecipitaciones con β -alanina con respecto al factor VIII. Las etapas de purificación adicionales pueden realizarse a temperatura ambiente mediante cromatografía con ayuda de intercambiadores aniónicos débiles. Igualmente pueden tener lugar la inactivación de virus con disolvente/detergente y una nanofiltración posterior de múltiples etapas a entre 25°C y 30°C.

Si se desea, se consigue un aumento de la concentración de factor VIII mediante diafiltración. El concentrado de factor VIII obtenido puede ultracongelarse o almacenarse de manera intermedia tras la liofilización. La disolución congelada, descongelada o el polvo liofilizado reconstituido se formula, se somete a filtración estéril, se llena en porciones y se somete en los viales llenos a una liofilización adicional. Al menos el 80% de la actividad de factor VIII presente debe encontrarse como factor VIII intacto, hasta el 20% de la actividad puede estar provocada por el factor

VIIIa. En una disolución, que contiene 100 U de factor VIII, no puede estar presente nada de actividad trombina, usándose un método de determinación, en el que pueden determinarse todavía 30 μ U de trombina por ml.

7. Preparaciones de complejo de protrombina libres de factores de coagulación activados:

5 Se mezcla 1 l de residuo de crioprecipitado con 16 g de A-50, un intercambiador aniónico débil, se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente y se separa mediante centrifugación el intercambiador iónico que ha absorbido un 90% o más de los factores de coagulación II, VII, IX y X contenido en el criorresiduo. El residuo, que contiene la cantidad principal de la albúmina contenida en el plasma o de las inmunoglobulinas contenidas en el mismo, se fracciona adicionalmente para la obtención von inhibidores, inmunoglobulinas y albúmina.

10 El intercambiador aniónico A-50 separado se lava exhaustivamente tres veces con en cada caso 5 l de disolución de cloruro de sodio 150 mM a temperaturas de entre 2°C y 4°C, y entonces con ayuda de una disolución de cloruro de sodio 500 mM se eluye el complejo de protrombina compuesto por los factores de coagulación II, VII y X e igualmente la cantidad principal del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) contenido en el criorresiduo. La operación de absorción a y elución del intercambiador aniónico débil A-50 se repite tantas veces hasta que en la prueba de generación de factor Xa no pueda determinarse nada de factor VIII por 10 U de protrombina. La
15 determinación de protrombina tiene lugar con ayuda de ecarina y medición de la meizotrombina y trombina formadas con sustrato cromogénico S-2238. La determinación de TFPI tiene lugar mediante la medición de la inhibición de la actividad del factor Xa. Por 1 U de protrombina deben estar presentes al menos 0,2 U de TFPI.

8. Proteínas terapéuticas estabilizadas en fármacos:

20 Antes de la formulación de preparaciones de principio activo que contienen proteínas terapéuticas, se establece mediante una formulación de prueba si todavía pueden establecerse actividades de proteasas, que destruyan funciones o estructuras de proteínas terapéuticas. Cuando en el procedimiento de purificación de proteínas terapéuticas la eliminación sea incompleta, en la formulación de los fármacos deben añadirse inhibidores de proteasa de alto peso molecular, atóxicos, seguros frente a virus, que inactiven las proteasas tanto que no conduzcan a una pérdida de eficacia y seguridad del fármaco. A la inversa, las cantidades de inhibidor añadidas no
25 pueden reducir la eficacia de una proteína terapéutica. La adición de inhibidores de proteasa de alto peso molecular, no tóxicos, tales como antitrombina III e inhibidor C₁, solos o juntos, tiene lugar ventajosamente con heparina no fraccionada o heparina HMW. La cantidad de inhibidores que debe añadirse se establece mediante la minimización necesaria de las actividades enzimáticas. Las preparaciones de principio activo, que contienen proteínas terapéuticas, se estudian con los sustratos cromogénicos S-2238, S-2302, S-2366, S-2403 y S-2765 para determinar su escisión mediante proteasas. En el caso de actividades proteasa demasiado elevadas se añaden inhibidores correspondientes para la reducción necesaria de la actividad enzimática. Cuando a partir de los estudios previos se deduce que cantidades de enzima que ya no pueden determinarse claramente con sustratos cromogénicos, ya
30 conducen a la reducción de la actividad, seguridad y estabilidad de fármacos que contienen proteínas terapéuticas, en particular en caso de un almacenamiento largo, entonces las determinaciones de actividad se realizan con los sustratos fluorogénicos correspondientes, que son sustratos hasta 100 veces más sensibles que los sustratos cromogénicos.

Las adiciones necesarias de inhibidores enzimáticos se determinan en una serie de concentración. Las muestras del fármaco que va a formularse se mezclan en una serie de concentración geométrica con inhibidores enzimáticos y, con respecto a 1 ml del fármaco listo para su uso, se añaden 100 nm de cada sustrato cromogénico. Estas mezclas
40 básicas pueden almacenarse, según los requisitos, liofilizadas, ultracongeladas o líquidas a la temperatura del frigorífico. Tras un almacenamiento de tres meses a temperaturas predeterminadas se descongelan o reconstituyen las mezclas básicas ultracongeladas o liofilizadas y en las tres series de mezcla básica se determinan fotométricamente las cantidades formadas de p-nitroanilina. En mezclas básicas control correspondientes, que sólo contienen sustratos cromogénicos disueltos en tampón en una concentración de 100 μ M, y que se produjeron y almacenaron de la misma manera que las muestras, se determina igualmente la cantidad de la p-nitroanilina formada, y estas cantidades se descuentan de los valores determinados de las mezclas básicas de muestra. Las
45 mezclas básicas con una adición de inhibidor suficiente así como aquéllas con concentraciones de inhibidor superiores a ésta y sus controles se almacenan aún tres días a la temperatura del frigorífico y 20 horas a 25°C. Se determinan aquellas cantidades de inhibidor o inhibidores, que impiden la formación adicional de p-nitroanilina.

50 La cantidad formada de p-nitroanilina tras una incubación a 37°C a lo largo de 24 horas no puede, en caso de usar sustrato cromogénico S-2238 por ml del fármaco listo para su uso, ascender a más de 100 nm de p-nitroanilina, en caso de usar S-2302 en la misma concentración no más de 200 nm, en caso de sustrato cromogénico S-2366 no más de 50 nm, en caso de sustrato cromogénico S-2403 no más de 100 nm y en caso de sustrato cromogénico S-2765 no más de 100 nm. Las mezclas básicas correspondientes contienen los sustratos cromogénicos en una
55 cantidad de 200 nm por ml. Los productos de partida, intermedios y terminados que van a estudiarse se añaden en cantidades tales que tras una incubación de 24 horas a 37°C y un grosor de capa de 10 mm no se lea un valor de extinción mayor de 1.000 en el fotómetro.

9. Controles de procedimiento en la producción de proteínas terapéuticas y controles de calidad de preparaciones de principio activo, que contienen proteínas terapéuticas:

Las actividades enzimáticas, que aparecen en la producción de proteínas terapéuticas, proceden tanto del material de partida, como de las proteasas que se forman durante la operación de producción a partir de zimógenos. Toda la operación de producción se monitoriza teniendo en cuenta las cantidades de proteasa que se encuentran en el material de partida, con respecto a la activación de zimógenos para dar proteasas, la eliminación de tales proteasas y las actividades proteasa aún restantes en las proteínas terapéuticas. Se miden trombina, calicreína, factor XIa, plasmina y factor Xa así como actividades proteasa de tipo trombina, de tipo calicreína, de tipo factor XIa, de tipo plasmina y de tipo factor Xa con los sustratos cromogénicos S-2238, S-2302, S-2366, S-2403 y S-2765. Todas las sustancias de alto peso molecular que se encuentran en el material de partida y se separan en el transcurso de la producción de las proteínas terapéuticas, se acumulan y se ultracongelan inmediatamente. Al final del procedimiento de producción se descongelan los residuos acumulados ultracongelados, se combinan y con ayuda de los cinco sustratos cromogénicos se estudian para determinar la actividad enzimática. En relación con el contenido en enzima del material de partida puede estimarse en qué medida tuvo lugar la activación de proenzimas durante el procedimiento de producción. Cuando en la producción de proteínas terapéuticas existe la sospecha de que por la presencia de los factores de coagulación VII y IX activados de manera directa o indirecta se producen acciones proteolíticas sobre una determinada proteína terapéutica, se llevan a cabo determinaciones adicionales de tales actividades enzimáticas con Spectrozym VIIa y IXa (American Diagnostics). En el caso de las proteínas terapéuticas que reaccionan de manera extremadamente sensible a las acciones de las proteasas, como por ejemplo el factor VIII, para aumentar la sensibilidad puede recurrirse en lugar de a sustratos cromogénicos a sustratos fluorogénicos.

La cantidad de una determinada proteasa presente en una muestra se lleva a cabo con ayuda de una curva de calibración. Las curvas de calibración se crearon para trombina con la norma NIBSC 89/580, para calicreína con calicreína humana de Coachrom 0,01 U/ml. La curva de calibración para el factor XIa se creó con un concentrado de factor XIa de American Diagnostics, normalizando 260 ng de factor XIa el tiempo de coagulación de un plasma deficiente en factor XI al 50%. Para la plasmina se usó la 3ª norma internacional de 1998 de NIBSC 97/536, para el factor Xa una preparación de referencia de NIBSC. Para la normalización de la preparación de factor XIa se fijó además qué cantidad de factor XIa expresada en ng corresponde a una cantidad de factor XI, que normaliza un plasma deficiente en factor XI al 50% en su tiempo de coagulación.

En caso de que no pueda conseguirse una reducción necesaria correspondiente de las actividades proteasa mediante antitrombina III, inhibidor C₁ y heparina o su combinación, pueden usarse los siguientes inhibidores, solos o conjuntamente, con antitrombina III, inhibidor C₁ y heparina: aprotinina, inhibidor de inter- α -tripsina, antiplasmina plasmática, antitripsina plasmática e inhibidor de la vía del factor tisular. Todos estos inhibidores deben ser seguros frente a virus.

Las preparaciones de principio activo que contienen las sustancias farmacéuticas activas (ICH: *drug substances*) están formuladas previamente de tal manera que se mantengan la actividad, inalterabilidad y estabilidad en caso de un almacenamiento correspondiente a lo largo de semanas a meses. Los controles de calidad necesarios se refieren esencialmente a conservar completamente la actividad farmacéutica y a la ausencia de actividad de procoagulación. Para determinar para una preparación de principio activo el tiempo de almacenamiento máximo, se determina el tiempo en el que todavía no se ha producido una disminución de la actividad farmacéutica, un aumento medible de la actividad proteasa y acortamientos de no más del 10% del tiempo de protrombina plasmática, del TTPA en plasma y el tiempo de recalcificación en plasma. Cuando se almacenan preparaciones de principio activo ultracongeladas y en un tiempo demasiado corto expira su capacidad de almacenamiento, entonces mediante liofilización y en caso necesario almacenamiento del principio activo liofilizado a -20°C puede aumentarse considerablemente la capacidad de almacenamiento.

10. Separación de enzimas y virus así como inactivación de virus e inhibición de enzimas en etapas de producción adicionales:

En el caso de diferentes procedimientos de producción de proteínas terapéuticas puede producirse la activación de una o más proenzimas. Tales enzimas pueden modificar desventajosamente las proteínas terapéuticas. La acción de algunas enzimas puede depender mucho del potencial redox. Para impedir el efecto fomentador del factor XIIIa sobre la formación de complejos de monómero de fibrina, puede reducirse en gran medida mediante la adición de cistina la actividad enzimática de factor XIIIa. A la inversa, mediante cisteína y otro medio de reducción puede aumentarse mucho la actividad de factor XIII. Dado que el factor XIII puede conducir ya a una concentración reducida a la formación con más frecuencia de complejos de monómero de fibrina, es necesario un método de determinación correspondientemente sensible.

El fibrinógeno libre de trombina, producido según el ejemplo 2, se mezcla para la eliminación de factor XIII y factor XIIIa en una disolución aproximadamente al 1% con cistina, hasta que la concentración de cistina alcanza una molaridad de 50 mM. Se precipita fibrinógeno a partir de esta disolución mediante adición de glicina (12%), se obtiene el depósito de fibrinógeno mediante centrifugación y se desecha el residuo. Se repite esta operación de 2 a 4 veces, disolviendo el precipitado en un tampón cistina 50 mM con citrato al 0,1% a pH 7,0 y repitiendo la precipitación con glicina. La precipitación de fibrinógeno se repite tantas veces hasta que el contenido en factor XIII no asciende a más de 10 mU por ml de una disolución de fibrinógeno al 1%.

Tal como se mostró en el ejemplo 2, puede impedirse en gran medida una escisión proteolítica mediante el uso de

aminoácidos a alta concentración en la producción de fibrinógeno. Tal como se muestra igualmente en el ejemplo 2, se logra inactivar actividades trombina perjudiciales mediante inhibidores de alto peso molecular, ávidos. La adición de sales inorgánicas con agentes caotrópicos favorece por un lado la escisión de uniones enzima-sustrato e inhibe con ello la actividad enzimática y permite al mismo tiempo una mejor separación de las enzimas de sus sustratos.

5 Para algunas acciones enzimáticas sobre sustratos de alto peso molecular es necesaria su configuración tridimensional, que se determina mediante un contenido en sal específico en un determinado intervalo de concentración. Mediante agentes complejantes tales como EDTA puede modificarse de manera reversible esta configuración de sustrato y con ello impedirse fuertemente la acción de diferentes enzimas sobre sus sustratos.

10 Las inactivaciones de virus, por ejemplo con detergentes, deben realizarse durante un tiempo prolongado en el intervalo de horas, igualmente a temperatura ambiente o una temperatura que se encuentra ligeramente por encima de ésta. Las proteínas terapéuticas, en el caso de que estén insuficientemente libres de proteasas o de tales sistemas de enzimas, que pueden formar proteasas, deben mezclarse con cantidades suficientes de inhibidores de proteasa, para que en la inactivación de virus no se produzca un daño proteolítico de una proteína terapéutica. En el ejemplo 2 se logra esto mediante la adición de r-hirudina. Igualmente, esto puede lograrse con ayuda de
15 antitrombina III y heparina en una proporción de 1 U de antitrombina con 6 U de heparina.

Para la eliminación de virus, los nanofiltros han resultado ser especialmente eficaces. La nanofiltración, en particular en filtros con diámetros de poro muy pequeños tal como 20 nm y 15 nm, avanza lentamente a temperatura ambiente. Mediante aumentos de temperatura hasta 40°C puede aumentarse considerablemente la velocidad de la filtración. Dado que la temperatura óptima de la mayoría de las proteasas se encuentra entre 35°C y 40°C, en una muestra de la disolución que va a someterse a nanofiltración de una proteína terapéutica se determina qué
20 cantidades de inhibidores de proteasa deben añadirse, para que la proteína terapéutica no se deteriore enzimáticamente.

Así se ajustan los concentrados de complejo de protrombina mediante dilución con tampón citrato al 0,1% a pH 7,0 a un contenido en proteína de 5 mg por ml y se filtran a través de filtros con diámetros de poro de 220 nm, 75 nm y 35 nm a temperatura ambiente. Se somete a filtración estéril el filtrado de la filtración de 35 nm y se filtra en condiciones asépticas a 40°C ± 2°C a través de filtros con diámetros de poro de 20 nm y 15 nm (Ashai). Se somete a ultrafiltración el filtrado de 15 nm a temperatura de frigorífico. El concentrado de complejo de protrombina así
25 obtenido debe estar libre de pirógenos y contener por 100 U de protrombina al menos 5 U de TFPI. La actividad enzimática del concentrado no puede ascender por 100 U, medido con sustratos cromogénicos, a más de 0,1 U de trombina, 0,1 U de plasmina, 100 ng de factor XIa, 0,2 U de factor Xa y 0,05 U de calicreína.

11. Determinación ultrasensible de trombina:

Mediante la incubación a largo plazo correspondiente de una enzima con un sustrato adecuado a su temperatura óptima y valor de pH óptimo puede conseguirse un aumento considerable de la sensibilidad de la determinación de la actividad enzimática. En el caso de una incubación a largo plazo es necesario estabilizar tanto la enzima como el
35 sustrato. Esto se consigue porque la determinación de la actividad trombina se realiza en una disolución, que contiene polietilenglicol al 1% con un peso molecular de entre 6000 y 8000. El tiempo de incubación puede fijarse en 15 horas, y pueden tomarse muestras de una mezcla básica de trombina tras 3 minutos, 10 minutos, 30 minutos, 1 hora y media, 5 horas y 15 horas. Según el sustrato usado la determinación de trombina puede llevarse a cabo todavía en el intervalo de desde microunidades (µU) hasta nanounidades (nU).

40 Para medir la actividad trombina durante el almacenamiento intermedio de productos intermedios o fármacos terminados, que contienen proteínas terapéuticas, sensibles a trombina, también puede prolongarse considerablemente el tiempo de incubación y modificarse la temperatura de manera correspondiente a la temperatura de almacenamiento necesaria. Este método también es adecuado para realizar estudios acelerados de estabilidad y para estudiar la idoneidad de determinados inhibidores de trombina. Un planteamiento de ensayo
45 correspondiente puede realizarse tal como sigue:

A partir de una muestra que va a estudiarse se produce una serie de dilución geométrica con un tampón Tris 50 mM pH 8,3, que contiene todavía PEG al 1% (peso molecular de 6000 a 8000) y NaCl a una concentración de 100 mM. También se usa este tampón para la producción de una disolución 400 µM del sustrato cromogénico S-2238, y se añaden 500 µl de la disolución de S-2238 a cada una de las diluciones de muestra. Como control se usan 500 µl de la disolución de S-2238, a la que se le añadieron 500 µl del tampón Tris. Estas mezclas básicas pueden incubarse a las temperaturas deseadas (de 0°C a 45°C) hasta varias semanas. Se midió fotométricamente el sustrato S-2238 escindido. A los valores de extinción leídos se les resta el valor de extinción del control y se usa el valor de la diferencia con ayuda de una curva patrón para el cálculo de la actividad enzimática.

12. Determinación de la integridad de fibrinógeno mediante cuantificación del fibrinopéptido A:

55 El fibrinógeno puro, intacto, contiene menos del 1% de fibrinopéptido A libre. El fibrinógeno se escinde mediante la proteasa trombina proteolíticamente en fibrinopéptido A y fibrinopéptido B, que presentan cada uno un peso molecular de aproximadamente 1500, y el monómero de fibrina con un peso molecular de aproximadamente 330000. Los monómeros de fibrina se separan de los fibrinopéptidos con etanol al 75% a temperatura ambiente. El

fibrinógeno y monómero de fibrina así precipitado se separa mediante centrifugación de los fibrinopéptidos que se encuentran en el residuo y para la eliminación total de fibrinógeno y monómero de fibrina se mezcla el residuo con una suspensión de bentonita en etanol al 75%. La bentonita se separa mediante centrifugación, se pasa el residuo de manera cuantitativa a un matraz de evaporación, se suspende el sedimento de bentonita con etanol al 75%, se centrifuga y se lleva el residuo igualmente al matraz de evaporación. La disolución se evapora en el matraz de evaporación a vacío hasta sequedad, se lleva el residuo a una cantidad medida de tampón y se determina el contenido en fibrinopéptido A con ayuda de un kit de prueba de Elisa. La separación descrita en este kit de prueba de fibrina y monómeros de fibrina mediante bentonita demostrado ser insuficiente (Novitec®, HiSS Diagnostics GmbH, Friburgo).

En el caso de una escisión completa de fibrinógeno mediante trombina se forman a partir de 1000000 ng de fibrinógeno aproximadamente 5000 ng de fibrinopéptido A. Cuando se escinde sólo el 1% del fibrinógeno presente, se forman correspondientemente sólo 50 ng de fibrinopéptido A. Con ayuda de una prueba de Elisa correspondientemente sensible es posible determinar incluso 1 ng de fibrinopéptido A por ml, de modo que con ello existe una posibilidad de determinar de manera suficientemente precisa la escisión de fibrinógeno mediante trombina a lo largo de todo el periodo de producción y almacenamiento de la proteína terapéutica.

Para realizar la determinación se mezclan 500 µl de la disolución que contiene fibrinógeno que va a estudiarse, que debe tener un contenido en fibrinógeno determinado de manera precisa, que debe encontrarse por encima de 1 mg de fibrinógeno por ml, con 1500 µl de alcohol absoluto, se mantiene 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga 3 minutos a entre 3000 y 5000 revoluciones por minuto. Se mezcla 1 ml del residuo con 2 ml de una suspensión alcohólica de bentonita, que se obtuvo a partir de 1 ml de la suspensión de bentonita presente en el kit con 3 ml de alcohol absoluto. Se centrifuga esta mezcla tras 10 minutos tras agitar fuerte y repetidamente. Se seca 1 ml del residuo en un evaporador a vacío y se disuelve el resto seco en 250 µl de tampón Tris a pH 7,0. Se utilizan 100 µl de esta disolución para la prueba de Elisa y se determina el contenido en fibrinopéptido A en ng en una curva patrón creada previamente. Se obtiene la curva patrón tal como sigue:

Se disuelve el fibrinopéptido A (Sigma) con tampón Tris y mediante diluciones correspondientes se obtienen disoluciones de fibrinopéptido-A de 1, 2, 5, 10 y 20 ng de fibrinopéptido A por ml. En cada caso 100 µl de estas diluciones se utilizan en la prueba de Elisa.

Esta prueba se realiza como ensayo competitivo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Elisa). Se mantienen 100 µl de las muestras que contienen fibrinopéptido A, liberadas de proteínas, una hora con 100 µl de un anticuerpo anti-fibrinopéptido A a temperatura ambiente en placas de microtitulación, cuyos pocillos están pretratados con un anticuerpo anti-IGg. A cada uno de los pocillos se le añaden 100 µl de conjugado de fibrinopéptido A-biotina y se incuba una hora adicional a temperatura ambiente. Tras el lavado de los pocillos de las placas de microtitulación se añaden a cada uno de los pocillos 100 µl de conjugado de estreptavidina-peroxidasa, y tras reposo de 30 minutos a temperatura ambiente se someten los pocillos de las placas de microtitulación a un lavado adicional. A cada uno de los pocillos se le añade sustrato enzimático TMB, y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente. Tras esto se detiene el desarrollo de color con 100 µl de ácido clorhídrico 1 M y se mide la extinción a 450 nm. Las extinciones leídas son inversamente proporcionales a la concentración de fibrinopéptido A de las muestras, cuyo contenido en fibrinopéptido A se determina con ayuda de una curva de referencia.

13. Determinación de la concentración de inhibidor enzimático.

40 Determinación de antitrombina:

El principio de la determinación es la medición de una cantidad de inhibidor, que reduce 1000 µU de trombina en 1 ml de volumen de tampón en presencia de una concentración 200 µM de sustrato cromogénico S-2238 a una duración de incubación de 24 horas y 37°C en un 50%.

Para la determinación de la cantidad de antitrombina se añaden diluciones del inhibidor en PEG al 1% a una mezcla de trombina-sustrato correspondiente y se completa con tampón Tris hasta 1 ml. Se mide la cinética de la actividad trombina aún presente al menos en cuatro momentos dentro del intervalo de 24 horas a una temperatura de 37°C. A partir de una curva de calibración creada anteriormente se determina la cantidad de inhibidor que inhibe el 50% de la actividad de 1000 µU de trombina. Esta cantidad de inhibidor se establece de manera arbitraria como 1 unidad de antitrombina.

50 La r-hirudina usada de Hoechst Marion Roussel se usó como fármaco terminado con el nombre comercial Recludan y se estudió respecto a su contenido en unidades arbitrarias de inhibidor.

Usando un tampón Tris de pH 8,3 y las adiciones indicadas en el ejemplo 1, se produjo una serie de dilución geométrica de la r-hirudina, que contiene r-hirudina contenida en concentraciones de desde 1 hasta 16 ng por ml. Se mezclan 500 µl de cada una de estas disoluciones de hirudina con 250 µl de una disolución 800 µM de sustrato cromogénico S-2238 y 250 µl de una disolución de trombina con 4 mU de trombina y se incuba 24 horas a 37°C. Un control, que sólo contiene trombina en una concentración de 1000 µU en una disolución 200 µM de sustrato cromogénico S-2238, se incuba igualmente durante 24 horas a 37°C. Como control adicional sirve una mezcla

básica de incubación de 24 horas de S-2238 200 μ M.

Tras la incubación de 24 horas se mide la extinción de las mezclas básicas individuales a 405 nm y se restan de las extinciones medidas el valor de extinción del control, que sólo contiene sustrato cromogénico. El valor de extinción de la disolución de trombina, que sólo contiene 1000 μ U de trombina por ml, de la que se restó el valor de blanco, se establece como el 100% de la actividad trombina presente y se determina la cantidad de hirudina que inhibe el 50% de esta actividad trombina.

Bibliografía

- Andersson LO, Forsman N, Huang K, Larsen K, Lundin A, Pavlu B, Sandberg H, Sewerin K, Smart J. Isolation and characterization of human factor VIII: Molecular forms in commercial factor VIII concentrate, cryoprecipitate, and plasma. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83:2979-2983.
- Brummel KE, Butenas S, Mann KG. An Integrated Study of Fibrinogen during Blood Coagulation. *J Biol Chem* 1999; 274:22862-22870.
- Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA. Proteolytic Processing of Human Factor VIII. Correlation of Specific Cleavages by Thrombin, Factor Xa, and Activated Protein C with Activation and Inactivation of Factor VIII Coagulant Activity. *Biochemistry* 1986; 25:505-512.
- Hemker HC. Thrombin Generation in a Reconstituted System: A Comment. *Thromb Haemost* 2002; 87:551-552.
- Johnson AJ, Fulton AJ. Antihemophilic Factor Stabilization. Patentes estadounidenses de 1994 y 1996; números de patente 5.278.289 y 5.484.890.
- Kunicki TJ, Montgomery RR. Method for Maintaining Intact, Non-Degraded Factor VIII/Von-Willebrand Factor During Blood Processing. Patentes estadounidenses de 1987 y 1992; números de patente 4.710.381 y 5.149.787.
- Lawson JH, Kalafatis M, Stram S, Mann KG. A Model for the Tissue Factor Pathway to Thrombin. *J Biol Chem* 1994; 269:23357-23366.
- Mann KG, Butenas S. Thrombin Generation in a Reconstituted System: A Reply. *Thromb Haemost* 2002; 87:552-554.
- Mutch NJ, Robbie LA, Booth NA. Human Thrombi Contain an Abundance of Active Thrombin. *Thromb Haemost* 2001; 86:1028-1034.
- Rotblat F, O'Brien DP, O'Brien FJ, Goodall AH, Tuddenham EGD. Purification of Human Factor VIII:C and Its Characterization by Western Blotting Using Monoclonal Antibodies. *Biochemistry* 1985; 24:4294-4300.
- Siebenlist KR, Meh DA, Mosesson MW. Protransglutaminase (Factor XIII) Mediated Crosslinking of Fibrinogen and Fibrin. *Thromb Haemost* 2001; 86:1221-1228.

REIVINDICACIONES

1. Fármaco, que contiene fibrinógeno seguro frente a virus como sustancia farmacéutica activa, así como eventualmente complejos de monómero de fibrina,
caracterizado porque
- 5 los complejos de monómero de fibrina eventualmente presentes constituyen menos del 4% de la proteína total (fibrinógeno y complejos de monómero de fibrina) y porque el fármaco presenta menos de 1 μ U de trombina por mg de fibrinógeno.