

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 491 215**

51 Int. Cl.:

C07K 14/745 (2006.01)

C07K 14/75 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2006 E 06013497 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 1739093**

54 Título: **Separación de proteínas plasmáticas**

30 Prioridad:

29.06.2005 FR 0506640

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.09.2014

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)
Groupement d'intérêt public 3, Avenue des
Tropiques ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

**NOGRE, MICHEL;
PORTE, PIERRE y
TELLIER, MICHEL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 491 215 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

Separación de proteínas plasmáticas

La presente invención se refiere a un procedimiento de separación de proteínas fibrinógeno, Factor XIII y cola biológica y de preparación de concentrados liofilizados de dichas proteínas, altamente purificados y también se refiere a dichos concentrados liofilizados susceptibles de obtenerse mediante el procedimiento.

El fibrinógeno es una proteína esencial de la coagulación sanguínea, ya que su polimerización en fibrina insoluble formada al final de la cascada de reacciones que controlan la coagulación, tiene como resultado la formación de un coágulo que obtura la lesión vascular, responsable del sangrado. De esta manera, la colocación del coágulo es esencial para garantizar que se detiene el sangrado. Además, la fibrina formada a nivel de la herida constituye una red fibrilar que garantiza la reparación tisular (cicatrización).

Las deficiencias congénitas en fibrinógeno pueden conducir a graves patologías. Para curar estas deficiencias, es necesario disponer de concentrados de fibrinógeno que puedan administrarse a los pacientes en tratamiento. También pueden curarse otras patologías mediante la administración de fibrinógeno, en particular en el caso de pérdidas masivas de sangre (cirugía, traumatismos, etc.), o a consecuencia de una coagulopatía de consumo descompensada (CID).

Por otra parte, las colas biológicas activables por la trombina que contienen fibrinógeno, como constituyente mayoritario, y Factor XIII (FXIII), se utilizan eficazmente para la reparación tisular en usos clínicos, tales como los injertos de piel, las suturas nerviosas o arteriales, como se describe, por ejemplo, en las patentes EP 0 305 243, FR 2 448 900 y FR 2 448 901. La presencia de Factor XIII o de transglutaminasa en estos productos contribuye a la estabilización de la fibrina mediante la creación de enlaces covalentes intercatenarios lo que la vuelve insoluble. En algunos casos, estos productos se obtienen de acuerdo con procedimientos de producción de fibrinógeno bastante complejos que requieren de un aporte exógeno de Factor XIII purificado para poder cumplir su función terapéutica.

Por consiguiente, disponer de concentrados de fibrinógeno, de colas biológicas, y de Factor XIII, en particular con fines terapéuticos, requiere técnicas de purificación que conducen a productos no solamente suficientemente purificados de contaminantes de diversa naturaleza, tales como proteínas acompañantes o coprecipitadas, anticuerpos o proteasa, si no también de mayor seguridad en el plano viral.

El aislamiento de fracciones enriquecidas en fibrinógeno, que contienen, dado el caso, FXIII, a partir de plasma ya se conoce y fue descrito inicialmente en los trabajos de Cohn y Nitschmann (Cohn et al, J. Am. Chem. Soc., 68, 459, 1946 y Kistler et al, Vox Sang., 7, 1962, 414-424). Métodos más recientes asocian técnicas de precipitación de diferentes fuentes de plasma y técnicas de filtración, cromatografía, inactivación viral etc. Se pueden citar, como ejemplo, las patentes y solicitudes de las patentes EP 0 359 593, US 5 099 003, EP 0 305 243, FR 2 448 900 y FR 2 448 901.

No obstante, se utilizan cada vez procedimientos diferentes para producir concentrados o composiciones bien de fibrinógeno, como se describe en la solicitud de la patente EP 1 457 497, bien de cola biológica, por ejemplo de acuerdo con la patente EP 0 771 324, o bien enriquecidos de fibrinógeno que contienen otras proteínas acompañantes como FXIII, Factor VIII, fibronectina, factor von Willenbrand etc. (en particular US 6 121 232).

Por lo tanto, estos procedimientos implican cadenas de producción distintas que utilizan, por consiguiente, métodos diferentes de obtención de las proteínas correspondientes empleando cada vez varias fuentes de materia prima. Además, pueden implicar, de acuerdo con el caso, costosos soportes cromatográficos, tales como los geles de afinidad a base de metal quelato (WO 2004/007533), susceptibles no obstante de liberar en los eluatos metales residuales, que pueden provocar reacciones indeseadas con las proteínas (por ejemplo oxidación). Esto plantea un problema de comodidad en la utilización a escala industrial cuando las necesidades conjuntas de estos tres principios activos se resienten. Estos problemas se acentúan aún más cuando las diferentes proteínas obtenidas de esta manera deben tratarse para inactivar y/o eliminar virus y otros contaminantes indeseados, como el príon.

A este respecto, algunos tratamientos de inactivación viral clásicos que consisten en un tratamiento térmico, tal como la pasteurización a 60 °C durante 20 h en presencia de estabilizantes protectores, y un tratamiento químico, tal como por solvente-detergente, cuyo objetivo es hacer compatibles los concentrados anteriormente citados con el uso terapéutico, no permiten inactivar completamente los virus, en particular los virus sin envoltura (parvovirus B19, hepatitis A y B etc.).

Para remediar este inconveniente, normalmente se recurre a métodos de inactivación viral más eficaces, tales como el calentamiento en seco en condiciones severas (80 °C, 72 h). Esta etapa requiere de la incorporación de una formulación estabilizante adecuada que ofrezca condiciones tales como, por ejemplo, la estabilización del fibrinógeno durante esta etapa, mientras que se destruyen los virus. Tal formulación ha sido objeto de una solicitud de patente FR 04 02001 depositada por la solicitante. Ahora bien, esta formulación se aplica a la estabilización de una proteína definida y no de las proteínas acompañantes, cuyas características son diferentes a las del fibrinógeno.

Las técnicas de filtración, en particular la nanofiltración que utiliza filtros de una porosidad de 35 nm, incluso inferior, también se utilizan para la eliminación viral. Sin embargo, esta técnica no puede utilizarse eficazmente sin conocer los parámetros físico-químicos que influyen en el rendimiento de recuperación de los compuestos a filtrar, y esto evitando la colmatación del filtro y el paso de diversos virus y contaminantes. Estos parámetros, tales como la fuerza iónica, el pH de la solución, así como las condiciones operativas de la filtración, imponen condiciones específicas de utilización que también dependen de la naturaleza del compuesto o compuestos presentes en la solución a filtrar. Aunque las solicitudes de las patentes EP 1 348 445 A1, EP 1 161 958 A1 y WO 99/23111 divulguen la casi total eliminación de los virus sin envoltura de muy pequeño tamaño presentes en las soluciones de proteínas, tales como los de la hepatitis A, mediante nanofiltración con filtros de 15 nm, todavía queda un riesgo de transmisión de virus indeseables o de priones.

Para remediar este riesgo, se puede realizar una doble, incluso triple, inactivación y/o eliminación viral asociando al menos dos técnicas cualesquiera de las mencionadas anteriormente, como se describe por ejemplo en la solicitud de la patente WO 2004/007533. Cuando se asocian estos tratamientos, es indispensable seleccionar, en función del método de inactivación viral, excipientes virucidas y/o estabilizantes protectores que no tengan simultáneamente una acción nefasta por ejemplo sobre los parámetros físico-químicos anteriormente citados que rigen la nanofiltración.

La solicitante pretende por lo tanto realizar un procedimiento de separación de fibrinógeno, de Factor XIII y de cola biológica activable por la trombina que responde a un doble objetivo. Por una parte, disponer de un único procedimiento que permita obtener conjuntamente concentrados de estas proteínas liofilizadas y altamente purificadas, a partir de una única materia prima plasmática que contiene fibrinógeno y Factor XIII, y por otra parte que este procedimiento sea compatible con al menos un tratamiento de inactivación y/o eliminación de virus y otros contaminantes indeseables (polímeros, agregados, prión).

Por consiguiente, la invención se refiere a un procedimiento de separación de proteínas fibrinógeno, Factor XIII y cola biológica de una fracción plasmática solubilizada, a base de fibrinógeno y Factor XIII, y de preparación de concentrados liofilizados de dichas proteínas que comprende las siguientes etapas:

a) purificación por cromatografía que comprende las etapas de:

- i) carga de un intercambiador de aniones de tipo débilmente básico en dicha fracción solubilizada, previamente equilibrada con un tampón de fuerza iónica predeterminada de pH básico, lo que permite retener la cola biológica,
- ii) elución de la cola biológica aumentando la fuerza iónica de dicho tampón,

- b) separación del Factor XIII a partir del fibrinógeno mediante la adición en al menos una parte del eluato de cola biológica al menos un agente químico precipitante del Factor XIII, y recuperación de la solución resultante de sobrenadante de fibrinógeno purificado, y
- c) diafiltración de las soluciones de fibrinógeno, de cola biológica y de FXIII puestas de nuevo en solución, seguida de una liofilización de dichas soluciones.

De esta manera, la solicitante ha encontrado que es posible obtener, a escala industrial, concentrados de fibrinógeno, de Factor XIII y de cola biológica liofilizados, altamente purificados, desprovistos de proteínas coprecipitadas y de contaminantes indeseables, mediante la utilización de un único procedimiento flexible que, en función de las necesidades, permite ajustar al máximo la producción de cada uno de los compuestos correspondientes, al mismo tiempo que garantiza una explotación óptima de la materia prima. Un procedimiento de este tipo simple, rápido y barato se utiliza fácilmente a escala industrial, lo que conduce a una mayor optimización de los diversos esquemas de producción.

Además, en función de la materia prima utilizada y de las utilizaciones consideradas, la adición de etapas suplementarias a este procedimiento de inactivación y/o eliminación viral conduce a los tres concentrados de interés, apropiados para usos terapéuticos.

De acuerdo con la invención, pueden utilizarse varias fuentes de materia prima que contenga fibrinógeno y Factor XIII. De esta manera, estas fracciones plasmáticas se obtienen mediante fraccionamiento de plasma recogido en condiciones desfavorables para el mantenimiento de un nivel suficiente de Factor VIII, que es una proteína lábil, de acuerdo con el método de Cohn que utiliza alcohol frío. También se puede considerar aplicar el fraccionamiento anterior a un crioprecipitado, que previamente se ha puesto de nuevo en solución, cuando no se pretende extraer el Factor VIII, por ejemplo en el caso de un crioprecipitado caducado o no conforme con respecto a la cantidad mínima de Factor VIII, o a plasma desprovisto de crioprecipitado. Por lo tanto, estas diferentes fuentes de fibrinógeno constituyen un precipitado de fracción I de Cohn, que a continuación, después de lavado, se solubiliza en cualquier tampón apropiado de pH neutro, conocido por el especialista. Como ejemplo, un tampón de este tipo es a base de cloruro sódico, citrato trisódico y L-arginina, de pH próximo a 7,4, cuya concentración en cada uno de estos componentes representa respectivamente, de manera preferida, 0,12 M, 0,01 M y 0,05 M.

Por lo tanto, la flexibilidad del procedimiento de la invención también está relacionada con la variedad de materias primas susceptibles de contener fibrinógeno extraíble, cuya purificación conduce a los tres concentrados correspondientes, para los usos terapéuticos pretendidos.

El procedimiento también puede comprender, antes de la etapa a), una etapa inicial de prepurificación de la fracción plasmática solubilizada mediante un tratamiento con hidróxido de aluminio y/o una precipitación a baja temperatura. La adición de hidróxido de aluminio garantiza la eliminación de las proteínas indeseables, tales como los Factores II (FII), VII, IX y X (FX). Esta fracción prepurificada puede congelarse a la espera de la realización de etapas posteriores del procedimiento de acuerdo con la invención.

La purificación por cromatografía de la fracción plasmática solubilizada se realiza en cualquier matriz a base de polímero natural o sintético, resina o gel, en la que se injertan agrupaciones de intercambiadores de aniones de tipo débilmente básico, tal como el DEAE. Soportes cromatográficos clásicos de este tipo están disponibles con la denominación DEAE-Sefarosa[®] CL-6B, DEAE-Trisacryl LS, Fractogel TSK-DEAE 650 M o S, DEAE-Macroprep (Bio-Rad, Francia) etc.

El tampón de equilibrio del intercambiador de aniones presenta una fuerza iónica predeterminada y debe estar a pH básico. Normalmente la fuerza iónica es inferior a 0,2 y, de preferencia, se sitúa en el intervalo de valores que van de 0,06 a 0,2, en particular, de 0,08 a 0,15. La fuerza iónica se ajusta de preferencia mediante la adición de sales inorgánicas de metales alcalinos o alcalinotérreos o su mezcla, de manera muy preferida sales inorgánicas de metales alcalinos, en particular cloruro sódico.

El valor máximo de pH del tampón de equilibrio se selecciona de manera que se evite cualquier desnaturalización de los productos correspondientes, es decir aproximadamente 10. Ventajosamente, el pH se sitúa en el intervalo de valores superiores a 7 hasta 9, de preferencia de 7,5 a 8,2. Como ejemplo, este tampón se compone de cloruro sódico, a pH 7,9-8,1, cuya concentración es 0,06 M, y además muy de preferencia puede comprender citrato trisódico, a una concentración preferida de 0,011 M. Puede utilizarse también cualquier otro tampón, a base de cloruro sódico o de sales inorgánicas de metales alcalinos o alcalinotérreos, que comprenda otros compuestos biológicamente compatibles y no desnaturantes para el producto de interés.

Cuando la solución anterior se aplica a los intercambiadores de aniones, la cola biológica queda retenida en el soporte. El procedimiento puede comprender, previamente a la etapa de elución de la cola biológica, una etapa de lavado, con dicho tampón de equilibrio, del intercambiador de aniones hasta la eliminación de las proteínas y los contaminantes no retenidos. Esta etapa de lavado, mediante percolación de este tampón en el soporte, permite el paso al filtrado de las proteínas presentes en la solución que contiene fibrinógeno, tales como las inmunoglobulinas G (IgG), A (IgA) y M (IgM) y la albúmina, y los contaminantes no retenidos o poco retenidos por el intercambiador, como los agentes químicos de inactivación viral. El tiempo de duración del lavado se determina midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm de longitud de onda del filtrado. De hecho, un valor de DO que corresponda al de la línea de base es un buen indicador de la eliminación efectiva de los compuestos citados anteriormente.

Después de volver a la línea de base, la elución de la cola biológica se realiza aumentando la fuerza iónica del tampón de equilibrio o de lavado, cuyo pH se fija de preferencia a 7,4-7,6. El valor de esta fuerza iónica se selecciona de manera que se obtenga una elución eficaz de la cola biológica al mismo tiempo que se cuida que este valor no altere las propiedades del producto correspondiente. Ventajosamente, el valor de la fuerza iónica está comprendido entre 0,5 y 1,3, en particular entre 0,9 y 1,1. Este aumento de la fuerza iónica se realiza mediante la adición de cualquier sal o mezcla de sales definidas anteriormente, en particular cloruro sódico. El tampón de elución además puede contener otros excipientes, tales como una mezcla de componentes, denominada mezcla A, que comprende citrato trisódico (10 a 12 g/l), lisina (1 a 5 g/l), glicina (1 a 5 g/l), sal tris (2 a 5 g/l), arginina (25 a 50 g/l) e isoleucina (5 a 15 g/l). La concentración de proteínas en el eluato es del orden de 4 g/l.

Al menos una parte de la cantidad recuperada de eluato de cola biológica se somete a un tratamiento cuyo objetivo es separar el FXIII que acompaña al fibrinógeno. Esta separación se realiza precipitando el FXIII mediante la adición en el eluato a tratar de un agente químico precipitante, que puede estar en forma de solución acuosa, a una concentración que permita obtener el efecto deseado. Siendo la preferencia las soluciones acuosas a base de sales de citrato 1 M, tales como el citrato sódico y, en particular, el citrato trisódico. De esta manera se separa un precipitado de FXIII y un sobrenadante muy enriquecido en fibrinógeno. El precipitado de FXIII puede recuperarse eficazmente mediante filtración en filtros de 5 µm.

El precipitado de FXIII recuperado así se pone de nuevo en solución, de preferencia en agua o un tampón. En particular, se disuelve en un tampón de mezcla A, ajustado a pH 6,9-7,1, para que su concentración corresponda a una actividad aproximadamente 100 veces superior a la del plasma normal. De esta manera, el precipitado de FXIII puede disolverse por ejemplo de manera que su concentración sea aproximadamente de 1 a 5 g de proteína total/l.

De acuerdo con la invención, las soluciones de cola biológica (eluato de cola biológica) y de fibrinógeno (sobrenadante enriquecido en fibrinógeno) pueden concentrarse mediante ultrafiltración, hasta cantidades normalmente comprendidas entre 15 y 25 g de proteína total/l determinadas mediante medidas clásicas conocidas por el especialista.

Las tres soluciones de fibrinógeno, de Factor XIII y de cola biológica obtenidas, dado el caso concentradas, se someten a una etapa de diafiltración. Esta etapa tiene como objetivo en primer lugar eliminar el exceso, dado el caso, por una parte, de sal inorgánica utilizada para obtener soluciones que tengan una fuerza iónica máxima de 0,2

- M, y, por otra parte, de agente precipitante presente en el precipitado puesto de nuevo en solución. Cabe señalar que una importante presencia de sal inorgánica, necesaria para la elución de la cola biológica, tendrá una influencia nefasta sobre la eficacia del proceso de liofilización e inactivación viral por calentamiento térmico en seco así como sobre la capacidad de retención de virus mediante un nanofiltro apropiado. Esta etapa también puede revelarse necesaria con el fin de incorporar, dado el caso, excipientes adecuados, estabilizantes y protectores, cuyo objetivo es permitir, por una parte, un calentamiento en seco del fibrinógeno, el FXIII y la cola biológica sin riesgo de desnaturalización, y, por otra parte, una solubilización rápida de los liofilizados, normalmente de 3 a 8 min. El tampón de diafiltración preferido contiene la mezcla A, y está a pH 6,9-7,1, por referencia a la solicitud de la patente FR 04 02001 depositada por la solicitante.
- 5
- 10 Conviene señalar que otra ventaja de la invención es, de acuerdo con otros modos preferidos de realización del procedimiento, que el tampón de diafiltración que comprende la mezcla A ya puede formar parte de la composición del tampón de elución de la cola biológica. Se simplifica y se optimiza, por lo tanto, la realización de la diafiltración.
- También pueden utilizarse los tampones de diafiltración de diferente composición en función de las necesidades, con la condición de que cumplan los criterios anteriormente enunciados.
- 15 La etapa de ultrafiltración mencionada anteriormente también puede realizarse en las mismas condiciones a este estadio del procedimiento.
- Las respectivas soluciones dado el caso diafiltradas, en su caso concentradas, se liofilizan de acuerdo con el método clásico y condiciones normales, es decir, entre -40 °C y -30 °C durante aproximadamente 48 horas.
- 20 Además, puede preverse al menos una etapa de tratamiento de inactivación viral y/o de eliminación de virus y de contaminantes citados anteriormente, como el príón. Este tratamiento puede seleccionarse del grupo constituido por el tratamiento químico de inactivación viral; la nanofiltración y el tratamiento térmico de inactivación viral en seco.
- De esta manera, esta etapa puede realizarse mediante un tratamiento químico clásico de inactivación viral, que consiste de preferencia en un tratamiento por solvente-detergente, siguiendo el método descrito en la patente EP 0 131 740. Los agentes químicos de inactivación viral representan de preferencia la mezcla de Tween-TnBP, de manera más preferida la mezcla de Tritón (octoxinol)-TnBP, cuyas concentraciones típicas son respectivamente del 0,3 % (v/v) y del 1 % (p/v). Esta inactivación viral puede realizarse en cualquier estadio del procedimiento, pero juiciosamente se realiza antes de la etapa a) de purificación por cromatografía. De esta manera, ésta contribuirá a la eliminación eficaz de los agentes de inactivación.
- 25
- De acuerdo con un modo preferido de realización del procedimiento, también puede preverse una etapa de nanofiltración para eliminar los virus, en particular los sin envoltura, y otros contaminantes exógenos, que complete el tratamiento químico anterior de inactivación viral. Se pueden utilizar eficazmente filtros de 35 nm, aunque pueden utilizarse otros filtros nanométricos en la medida que los tiempos de duración de filtración y la eficacia de retención viral estén optimizados. La nanofiltración se realiza bien con el eluato obtenido mediante la etapa a) o bien, en su caso, con las soluciones diafiltradas de fibrinógeno, de cola biológica y de FXIII puesto de nuevo en solución, antes de la liofilización. La selección juiciosa de los parámetros químicos de la purificación por cromatografía y de los de la diafiltración permite una flexibilidad en la realización de la nanofiltración sin modificar los resultados.
- 30
- Finalmente, el tratamiento térmico de inactivación viral en seco se realiza con los liofilizados de fibrinógeno, de cola biológica y de FXIII obtenidos después de la etapa de liofilización, de acuerdo con las condiciones clásicas, a 80 °C durante 72 horas, para inactivar los virus sin envoltura que no hayan sido inactivados y/o eliminados mediante al menos una de las dos etapas anteriores de inactivación viral y/o eliminación de virus.
- 35
- Los liofilizados calentados en seco pueden reconstituirse a continuación en un medio acuoso compatible con un uso clínico, de preferencia en agua purificada para inyección (PPI), y directamente inyectarse por vía intravenosa.
- El procedimiento de acuerdo con la invención, además puede constar de al menos una etapa de filtración clarificante, para eliminar partículas contaminantes insolubles, y de al menos una etapa esterilizante, realizándose éstas normalmente mediante la utilización de filtros, por ejemplo, de 0,8 a 0,1 µm. En particular, éstas se refieren a la fracción plasmática solubilizada prepurificada, al eluato de cola biológica obtenido mediante la etapa b) y/o a las soluciones diafiltradas de los tres compuestos de interés.
- 45
- De esta manera, la realización del procedimiento conduce a liofilizados de concentrados de cola biológica y de fibrinógeno altamente purificados, cuya cantidad respectiva de fibrinógeno, con respecto a la cantidad total de proteína, es aproximadamente del 90 %. Además, las actividades de Factor XIII en los concentrados de cola biológica y de fibrinógeno son aproximadamente de 5 U/ml y aproximadamente de 1,5 U/ml, respectivamente.
- 50
- El concentrado de Factor XIII obtenido está desprovisto de proteínas contaminantes y presenta una actividad, de acuerdo con las necesidades, situada en el intervalo de valores que van de aproximadamente 30 U/ml a aproximadamente 700 U/ml, de preferencia de 100 U/ml a 400 U/ml, obtenida en función de la concentración de la puesta de nuevo en solución del precipitado de FXIII y/o de la obtenida después de la ultrafiltración.
- 55

5 La invención también se refiere a los concentrados liofilizados de fibrinógeno, de cola biológica y de Factor XIII, susceptibles de obtenerse mediante la realización del procedimiento anterior, caracterizados por que comprenden la mezcla de constituyentes del tampón de diafiltración (mezcla A). Además, dichos concentrados pueden ser de calidad terapéutica gracias a la adición en el procedimiento de la invención de al menos una etapa de tratamiento de inactivación viral y/o de eliminación de virus y contaminantes.

El ejemplo que sigue muestra un modo de realización de la presente invención.

Ejemplo

10 Se utiliza 1200 l de plasma humano desprovisto de crioprecipitado. Este plasma se somete a una precipitación etanólica mediante el método de Cohn, de acuerdo con las condiciones conocidas por el especialista, de manera que la concentración de etanol en el plasma correspondiente sea del 8 % (v/v) y la temperatura de la mezcla obtenida de esta manera sea de -3 °C.

A continuación, el sobrenadante y el precipitado obtenidos así se centrifugan. Se obtienen 10 kg de precipitado, que constituye la fracción I de Cohn impura.

15 La fracción I de Cohn impura (10kg) se suspende de nuevo y se lava con 300 l de tampón "Blombach", constituido de una mezcla de glicina 1 M, citrato trisódico 0,55 M y etanol 6,5 % (v/v), a pH de 6,8.

Después del centrifugado, se recuperan 8 kg de pasta de precipitado purificado (fracción I de Cohn purificada) que se disuelven a una temperatura de 37 °C, en 60 l de tampón constituido de una mezcla de cloruro sódico 0,12 M, citrato trisódico 0,010 M y arginina 0,05 M; de pH 7,4.

20 A continuación, la solución de precipitado obtenida de esta manera se somete a una prepurificación mediante tratamiento con gel de alúmina en razón de 108 g por 1 kg de pasta de precipitado, a una temperatura de 25 °C y a pH de 6,9-7,1.

Una vez realizado el tratamiento de prepurificación, la solución se somete a filtraciones lenticulares clarificantes, por medio de filtros en fibras de celulosa (Seitz, tipo K700) de 0,65 µm y esterilizantes mediante filtros de 0,2 µm.

25 Esta solución prepurificada se somete a un primer tratamiento de inactivación viral por solvente-detergente en presencia de Tween®-TnBP, de concentraciones respectivas de 0.3 % (v/v) y de 1 % (p/v), de acuerdo con el método descrito en EP 0 131 740.

La solución prepurificada tratada de esta manera se diluye del 50 % mediante la adición del volumen necesario de una solución acuosa de citrato trisódico 0,010 M.

30 La solución prepurificada obtenida así, además del fibrinógeno y del Factor XIII acompañante, también contiene proteínas indeseables tales como las inmunoglobulinas G y la albúmina, y contaminantes tales como el Tween®-TnBP. La eliminación eficaz de estos componentes se realiza mediante una etapa de cromatografía.

35 A este respecto, la solución prepurificada se inyecta en una columna de cromatografía rellena de un gel intercambiador de aniones DEAE Macrorep (Bio-Rad, Francia), previamente equilibrada con un tampón constituido de cloruro sódico 0,06 M y citrato trisódico 0,011 M, ajustado a pH de 8,0, de osmolaridad de 130-150 mosmolkg⁻¹. En estas condiciones, el fibrinógeno y el Factor XIII, que constituyen la cola biológica, quedan retenidos por el soporte. Las proteínas poco o no retenidas por el soporte se eliminan en el filtrado, así como el Tween y el TnBP, mediante lavados sucesivos con el mismo tampón.

40 Cuando la DO, medida a 280 nm, desciende de nuevo al valor de la línea de base, se realiza la elución del fibrinógeno y del Factor XIII, que constituyen la cola biológica, con un tampón de elución que contiene cloruro sódico 1 M y una mezcla A' constituida de citrato trisódico (11,2 g/l), lisina (2,0 g/l), glicina (2,0 g/l), sal tris (2,40 g/l), arginina (40 g/l) e isoleucina (10 g/l), ajustado a pH de 7,5, de osmolaridad > 2000 mosmolkg⁻¹.

45 El eluato de cola biológica purificada recuperado de esta manera se somete a una nanofiltración en filtros PLANOVA (Asahi-Japón) de 35 nm y de 1 m² de superficie, con el fin de eliminar los virus que no se hayan inactivado mediante el tratamiento solvente-detergente anterior. La cantidad de proteínas totales en este estadio del procedimiento es de 4,0 g/l de solución aproximadamente.

Se aísla el 50 % del volumen de eluato de cola biológica y se adiciona una solución de citrato trisódico 1 M al resto del volumen de eluato para precipitar el Factor XIII. Después de asegurarse que todo el Factor XIII ha precipitado, éste se aísla y se recupera mediante filtración en filtros Sartopure (Sartorius-Francia) de 5 µm.

50 El precipitado de FXIII recuperado de esta manera se pone de nuevo en solución en agua purificada para inyección, a razón de 1 g/l aproximadamente.

Las soluciones de cola biológica (eluato) y de fibrinógeno se concentran por ultrafiltración en filtros Biomax Millipore 100 kDa de 5 m² de superficie, de manera que la cantidad en proteínas de cada una de las soluciones alcance 15

ES 2 491 215 T3

g/l.

Las soluciones concentradas anteriores y la solución de FXIII se someten a una diafiltración en los mismos filtros que los utilizados para la ultrafiltración de la mezcla A' definida anteriormente, de pH 6,9-7,1, de osmolaridad de 590-610 mosmolkg⁻¹ lo que también permite la eliminación del cloruro sódico.

- 5 Después de haber procedido a una filtración esterilizante en filtros de 0,45-0,2 µm, se extraen 100 ml de las respectivas soluciones diafiltradas y se colocan en frascos de cristal para realizar una liofilización entre -40 °C y -30 °C durante 48 horas aproximadamente.

- 10 Los liofilizados de fibrinógeno, de cola biológica y de Factor XIII obtenidos se someten a una última etapa de inactivación viral mediante calentamiento en seco a 80 °C durante 72 horas y se almacenan para una utilización terapéutica ulterior.

Los resultados de los controles de calidad realizados en 3 lotes consecutivos se indican en la siguiente tabla.

Proteínas	FXIII ^a	Cola biológica	Fibrinógeno
Rendimiento (%)	-	87 ± 3	93 ± 4
FXIII:Ag (U/ml)	31,1 ± 2,1	9,3 ± 0,4	2,6 ± 0,9
Actividad en FXIII (U/ml)	33,3 ± 1,5	5,2 ± 0,4	1,3 ± 0,6
Fibronectina (mg/ml)	0,16 ± 0,03	1,10 ± 0,04	1,10
IgM (µg/ml)	35 ± 0,4	209 ± 46	183 ± 31
IgG (µg/ml)	6 ± 2	29 ± 6	29 ± 5
IgA (µg/ml)	< 12 ± 3	55 ± 2	40 ± 4
FII:Ag	3 ± 0,2 (µg/l)	1,9 ± 0,6 (mU/ml)	1,2 ± 0,2 (mU/ml)
Actividad en FX (mU/ml)	-	< 1,3 ± 0,04	< 1,3 ± 0,03
Plasminógeno (µg/ml)	-	73 ± 4	73 ± 7
a: concentración de 1,2 g/l de proteína total			

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de separación de proteínas fibrinógeno, Factor XIII y cola biológica de una fracción plasmática solubilizada, a base de fibrinógeno y Factor XIII, y de preparación de concentrados liofilizados de dichas proteínas que comprende las etapas de:
- 5 a) purificación por cromatografía que comprende las etapas de:
- i) carga de un intercambiador de aniones de tipo débilmente básico en dicha fracción solubilizada, previamente equilibrada con un tampón de fuerza iónica predeterminada de pH básico, lo que permite retener la cola biológica,
- ii) elución de la cola biológica aumentando la fuerza iónica de dicho tampón,
- 10 b) separación del Factor XIII a partir del fibrinógeno mediante la adición de al menos un agente químico precipitante del Factor XIII en al menos una parte del eluato de cola biológica, y recuperación de la solución resultante de sobrenadante de fibrinógeno purificado, y
- c) diafiltración de las soluciones de fibrinógeno, de cola biológica y de FXIII puestas de nuevo en solución, seguida de una liofilización de dichas soluciones.
- 15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el tampón de equilibrio tiene una fuerza iónica inferior al valor de 0,2 y, de preferencia, se sitúa en el intervalo de valores que van de 0,06 a 0,2.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** el pH del tampón de equilibrio se sitúa en el intervalo de valores superiores a 7 hasta 9, de preferencia de 7,5 a 8,2.
4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** comprende, previamente a la etapa de elución de la cola biológica, una etapa de lavado, con dicho tampón de equilibrio, del intercambiador de aniones hasta la eliminación de las proteínas y los contaminantes no retenidos.
- 20 5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la elución de la cola biológica se realiza con el tampón de equilibrio cuya fuerza iónica está comprendida entre 0,5 y 1,3, en particular entre 0,9 y 1,1, y está a pH comprendido entre 7,4 y 7,6.
- 25 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** el tampón de elución además contiene una mezcla de 10 a 12 g/l de citrato trisódico, de 1 a 5 g/l de lisina, de 1 a 5 g/l de glicina, de 2 a 5 g/l de Tris, de 25 a 50 g/l de arginina y de 5 a 15 g/l de isoleucina.
7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** el agente químico precipitante del Factor XIII está en forma de solución acuosa a base de sales de citrato 1 M.
- 30 8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el precipitado de FXIII se pone de nuevo en solución en agua o en un tampón que contiene una mezcla de 10 a 12 g/l de citrato trisódico, de 1 a 5 g/l de lisina, de 1 a 5 g/l de glicina, de 2 a 5 g/l de Tris, de 25 a 50 g/l de arginina y de 5 a 15 g/l de isoleucina, ajustado a pH comprendido entre 6,9 y 7,1.
- 35 9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** la diafiltración se realiza con el tampón definido en la reivindicación 8.
10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** comprende al menos una etapa de tratamiento de inactivación viral y/o de eliminación de virus y contaminantes, seleccionándose el tratamiento del grupo constituido por el tratamiento químico de inactivación viral, la nanofiltración y el tratamiento térmico de inactivación viral en seco.
- 40 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** el tratamiento químico de inactivación viral se realiza previamente a la etapa a).
12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en que el tratamiento químico de inactivación viral consiste en un tratamiento por solvente-detergente realizado por agentes químicos que representan la mezcla de Tween®-TnBP o de tritón-TnBP.
- 45 13. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, **caracterizado porque** la nanofiltración se realiza con el eluato obtenido mediante la etapa a) o con las soluciones diafiltradas de fibrinógeno, de cola biológica y de FXIII puestos de nuevo en solución, antes de la liofilización.
14. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, **caracterizado porque** el tratamiento térmico de inactivación viral en seco se realiza con los liofilizados de fibrinógeno, de pegamento biológico y de FXIII obtenidos después de la etapa de liofilización.
- 50

15. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado porque** comprende una etapa de ultrafiltración de concentración realizada previamente a la etapa de diafiltración o posteriormente a dicha etapa, antes de la liofilización.
- 5 16. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado porque** comprende, antes de la etapa a), una etapa inicial de prepurificación de la fracción plasmática solubilizada mediante un tratamiento con hidróxido de aluminio y/o una precipitación a baja temperatura.
17. Concentrado liofilizado de fibrinógeno, susceptible de obtenerse mediante la realización del procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado porque** comprende la mezcla de los componentes del tampón de diafiltración definido en la reivindicación 8.
- 10 18. Concentrado liofilizado de cola biológica, susceptible de obtenerse mediante la realización del procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado porque** comprende la mezcla de los componentes del tampón de diafiltración definido en la reivindicación 8.
- 15 19. Concentrado liofilizado de Factor XIII, susceptible de obtenerse mediante la realización del procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado porque** comprende la mezcla de los componentes del tampón de diafiltración definido en la reivindicación 8.
20. Concentrado liofilizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, de calidad terapéutica, obtenido mediante la realización del procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 a 14.