

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 425**

51 Int. Cl.:

C07K 14/745 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2012 E 12721193 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 2699594**

54 Título: **Proceso para la preparación de un concentrado del FV con virus inactivados que se inicia a partir del suero humano, a un nivel de escala industrial**

30 Prioridad:

22.04.2011 IT FI20110084

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

06.10.2015

73 Titular/es:

**KEDRION S.P.A. (100.0%)
Localita' ai Conti 5
55051 Castelvecchio Pascoli - Barga, IT**

72 Inventor/es:

**ROSSI, PAOLA;
NARDINI, ILARIA;
GIOVACCHINI, PIERANGELO;
MORI, FILIPPO y
FARINA, CLAUDIO**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 547 425 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

Proceso para la preparación de un concentrado del FV con virus inactivados que se inicia a partir del suero humano, a un nivel de escala industrial

5

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de productos sanguíneos, en particular a la purificación del FV humano. En particular se refiere a la obtención de un concentrado de FV adecuado para el tratamiento de patologías asociadas con deficiencias/cambios en esta proteína.

10

Estado de la técnica

[0002] El factor V tiene un papel esencial en la cascada de coagulación sanguínea. Después de su activación por la trombina y el FXa, actúa como un cofactor de FXa por sí mismo en el complejo protrombinasa, dando como resultado un aumento significativo de la tasa de generación de trombina. La actividad de FVa entonces se regula negativamente por hidrólisis por APC. Además de esta función pro-coagulante, el FV actúa también como un anticoagulante: la hidrólisis de la cadena sencilla de FV por APC convierte el FV en una molécula que actúa como un cofactor de APC por sí mismo en la activación de FVIIIa.

15

20

[0003] Aproximadamente el 80% del FV circula en el plasma a una concentración de 7-10 µg/ml; el 20% restante se acumula en los α-gránulos de las plaquetas. El FV del plasma se sintetiza en los hepatocitos como un pro-cofactor de cadena sencilla con un PM de 330 KDa; la fracción plaquetaria, parcialmente proteolizada y asociada con multimerina, se sintetiza parcialmente en los megacariocitos y se absorbe parcialmente del plasma por endocitosis. Estructuralmente, la cadena FV sencilla se organiza en los dominios estructurales A1-A2-B-C1-C2; la eliminación del dominio B genera el FVa, que está compuesto por dos cadenas que se mantienen unidas por enlaces no covalentes y se estabilizan por iones Ca⁺⁺. En particular, la hidrólisis por FXa y trombina en los restos de aminoácidos Arg709, Arg1018 y Arg1545, da como resultado la liberación de FVa que consiste en una cadena pesada, con un PM de 105 KDa, y una cadena ligera con un PM de 74-71 KDa. La regulación negativa por APC se consigue entonces por medio de proteólisis en los restos Arg506, Arg306 y Arg679; se consigue un mecanismo alternativo de inactivación del FV mediado por trombina por hidrólisis en la Arg643 en presencia de células endoteliales. La hidrólisis de la cadena sencilla de FV por APC en la Arg506 convierte el FV en una molécula con actividad anticoagulante.

25

30

[0004] Las formas de FV resistentes a APC se describen en la bibliografía, tal como FV-Leiden, FV-Cambridge y FV-Hong Kong, dando como resultado la prolongación de la actividad de FVa, que se asocia con la aparición de fenómenos trombóticos. También se conoce otra forma de trastorno de coagulación, que se atribuye a la deficiencia de FV, y por lo tanto que se caracteriza por episodios hemorrágicos. Más precisamente, la Parahemofilia, una patología extremadamente rara con una incidencia de 1 caso por cada 1.000.000, que se clasifica entre los Trastornos de Coagulación Heredados Recesivamente (RICD), que se reconoce como un defecto congénito de FV cualitativo (Tipo II) o cuantitativo (Tipo I), que se transmite de manera autosómica recesiva. La deficiencia de FV adquirida también es posible como consecuencia del desarrollo de inhibidores, que en general aparecen por el uso tópico de trombina bovina, patologías reumáticas o tratamientos con antibióticos. Como una parte del FV circulante está contenido dentro de los α-gránulos de las plaquetas, se puede producir también una reducción de su concentración en el caso de cambios de las últimas. Las manifestaciones clínicas de la deficiencia de FV, que se atribuyen a la función pro-coagulante de esta proteína, varían en extensión y frecuencia, y están representadas principalmente por hemorragias cutáneas y mucocutáneas, y también por hemorragia muscular, hemartrosis, episodios hemorrágicos genitourinarios, gastrointestinales y del SNC. Otra patología relacionada es la deficiencia congénita asociada con el Factor V y el Factor VIII, que por sí misma también es una enfermedad hemorrágica muy rara, en la que hay una reducción simultánea de la concentración de ambos factores, generalmente entre un 5% y 20% de los niveles plasmáticos normales. En este caso, la causa principal de la patología está representada por un defecto en un único gen que produce la alteración del transporte de los dos factores celulares hepáticos en la circulación sanguínea. La sintomatología hemorrágica es similar a la que se observa en la deficiencia de FV, pero con un aumento de la frecuencia de hemartrosis (el 50% de los casos).

35

40

45

50

55

[0005] La escasez de las patologías asociadas con la deficiencia de FV se refleja en un progreso terapéutico lento. Además, la terapia de remplazo para pacientes afectados de parahemofilia y deficiencia combinada de Factor V y Factor VIII actualmente se basa solo en el uso de Plasma Nuevo Congelado (FFP). Sin embargo el uso de FFP no representa un tratamiento ideal debido a los efectos secundarios resultantes, principalmente el aumento de volumen de plasma, la necesidad de un cuidadoso control y la posible administración de diuréticos, y el riesgo de infección vírica.

60

[0006] Las posibles alternativas incluyen el uso de agentes antifibrinolíticos, que solo son eficaces en el tratamiento de hemorragias menores, o la administración de rFVIIa y FEIBA, que sin embargo no constituyen un tratamiento específico, y que a veces da lugar a un riesgo de trombosis.

65

[0007] La disponibilidad de un concentrado de FV, con un buen nivel de pureza y seguro desde el punto de vista vírico, podría por lo tanto ofrecer una alternativa terapéutica más eficaz y dirigida en el tratamiento de las deficiencias de FV.

5 **[0008]** Debido a la falta de interés en el desarrollo de productos que contuvieran FV purificado, actualmente no hay procesos de purificación que consistan en un número limitado de etapas que hagan posible obtener buenos rendimientos de FV adecuados para la producción de dicha proteína a escala industrial.

10 **[0009]** En el fraccionamiento tradicional, no existen etapas en las que haya un enriquecimiento del FV, de esta manera se han desarrollado numerosos procesos de purificación que en la mayoría de los casos hace posible obtener FV del plasma o sobrenadante crio-agotado. Los métodos de purificación de FV descritos en la bibliografía casi siempre prevén el uso de numerosas etapas, muchas de las cuales consisten en etapas de precipitación con excipientes que a menudo son difíciles de eliminar del producto final, y/o el uso de métodos cromatográficos caros que no están fácilmente disponibles, tales como los que implican inmunoafinidad.

15 **[0010]** Los primeros intentos de purificación FV descritos en la bibliografía prevén el uso de los métodos clásicos de precipitación en hidróxido de aluminio y cloruro de bario. Casi todos los estudios prevén el uso de PEG, frecuentemente en combinación con otras etapas de precipitación. Dichas precipitaciones, que pueden producir la desnaturalización e inactivación de proteína lábiles tales como el FV, se han utilizado predominantemente con el fin de separar el FV de proteínas del complejo de protrombina, tales como FII, FVII, FIX y FX. La precipitación con hidróxido de aluminio también se describe en algunas patentes: en JP56049394(A), la fracción II derivada del fraccionamiento de Cohn, se incuba con un monosacárido y luego se precipita utilizando dicho óxido, de forma que se separa el FV de los factores de coagulación que puedan desencadenar la cascada de coagulación. La patente CA1293214(C)-1991 también describe un proceso para la purificación de FV que comienza a partir del plasma humano o sobrenadante crio-agotado, que implica la precipitación con hidróxido de aluminio como una primera etapa, seguida por la incubación con resina Sephadex A50 DEAE y posteriormente precipitación en sulfato amónico.

20 **[0011]** Además de manera alternativa, o en asociación con las técnicas de precipitación, se han utilizado etapas de purificación por cromatografía con varias técnicas, que incluyen: interacción de absorción en hidroxiapatita, permeabilidad en gel, afinidad, interacción hidrófoba, inmunoafinidad.

30 **[0012]** La etapa de purificación cromatográfica que se incluye más frecuentemente es intercambio iónico, en particular, intercambio aniónico, utilizando soportes unidos a grupos funcionales catiónicos débiles o fuertes.

35 **[0013]** Entre los intercambiadores aniónicos fuertes se encuentran soportes con grupos de amonio cuaternario sobre celulosa o matrices de agarosa. Los intercambiadores aniónicos débiles que se utilizan predominantemente tienen grupos funcionales Sephadex A50 DEAE sobre matrices de celulosa, agarosa o dextrano.

40 **[0014]** En el proceso informado en las patentes que describen la purificación de FV, se utiliza frecuentemente el soporte Sephadex A50 DEAE como intercambiador aniónico en modo de unión.

45 **[0015]** En la patente US 5.219.995, la primera etapa de purificación de FV implica la incubación del plasma o el sobrenadante crio-agotado con dicho medio de cromatografía con 0,03 M de tampón fosfato y 0,03 M de citrato, y la elución posterior del FV junto con los factores II, IX y X con 0,03 M de tampón fosfato y 0,03 M de citrato, que contiene 0,2 M de cloruro sódico. Con el fin de separar el FV de los factores mencionados anteriormente, se lleva a cabo una etapa posterior de precipitación en cloruro de bario. El FV recuperado en el sobrenadante se purifica por lo tanto parcialmente, incluso aunque la actividad específica, evaluada por el ensayo de espectrofotometría, sea muy baja (S.A. FV: 0,027 UI/mg).

50 **[0016]** Por otra parte, la patente EP0756638B1 describe un fraccionamiento del plasma inicial de selección intermedio con el fin de verificar la fracción más adecuada que se va a utilizar como material de arranque para la purificación y, después de haberse verificado la recuperación de al menos un 80% del FV en el sobrenadante crio-agotado, investiga la unión de la proteína al Sephadex DEAE, en la etapa utilizada en el proceso de fraccionamiento tradicional de PTC. Además, se demostró que aumentando la relación resina/muestra con respecto al proceso de referencia y alterando la fuerza iónica del sobrenadante, es posible aumentar el rendimiento del FV en el eluido que contiene PTC bruto. En cualquier caso, la optimización que se describe para la etapa de unión a la resina prevé la elución del FV junto con el complejo protrombina y la obtención de un producto muy impuro (S.A. FV: 0,4 UI/mg).

55 **[0017]** En la patente CA1293214(C)-1991, el FV se purifica una vez más comenzando a partir del plasma o sobrenadante crio-agotado, y en la primera etapa los factores que componen el complejo de protrombina se precipitan utilizando hidróxido de aluminio, mientras el FV se recupera del sobrenadante. La fracción que contiene FV se incuba entonces en lotes con la resina Sephadex A50 DEAE con una relación muy alta (13,6 g/l de muestra) a un pH de 7,5 en 0,02 M de tampón de citrato y 0,06 M de NaCl, obteniendo así la unión el FV al soporte, que posteriormente se transfiere a una columna de cromatografía. El eluido que contienen FV se obtiene de esta manera lavando con una solución que contiene 1 M de NaCl, 1 UI/ml de heparina, 0,2 UI/ml de ATIII y 5 mM de CaCl₂. Además, para obtener una preparación estable de FV, no es adecuada la presencia de anticoagulantes, y se deben

retirar más tarde del producto, solo el eluido se somete a precipitación adicional con sulfato amonio, seguida por resuspensión, diálisis y secado por congelación. Además los datos de rendimiento, actividad específica o estabilidad del producto obtenido por este laborioso y agresivo proceso no están disponibles.

5 **[0018]** Por lo tanto, en los métodos de purificación del FV descritos hasta ahora prevén el uso de numerosas etapas de purificación, que incluyen métodos de precipitación que causan la desnaturalización e inactivación del FV. La separación del FV de los factores del complejo de protrombina, necesaria para la obtención de un producto que contenga FV estable, solo se ha obtenido además utilizando este tipo de técnica agresiva o utilizando anticuerpos dirigidos contra el FV, los cuales, con la implicación del coste y la dificultad para nada insignificante de la ejecución, se han unido a un soporte de cromatografía y se han utilizado para aislar el FV. Incluso en los procesos descritos más recientemente, que prevén un tratamiento más suave de la proteína y su aislamiento por inmunofinidad e intercambio aniónico solo (WO 2010/069946), no permiten rendimientos satisfactorios de FV (no mayores del 30%) e implica todas las dificultades asociadas con el uso de un soporte de inmunofinidad. Esto incluye una preparación complicada del medio de cromatografía y un escaso número de ciclos de reutilización: además, los grupos funcionales que presentan el anticuerpo tiene una susceptibilidad mayor a los tratamientos agresivos tales como la regeneración y exposición a pH extremos con respecto a los grupos funcionales clásicos.

20 **[0019]** En los pocos procesos descritos en los que la estabilidad del FV en el producto final se ha evaluado, la proteína solo mantiene su integridad por medio de la adición de un cóctel inhibidor de proteasas (que incluya Benzamidina, DFP, PMSF y STI) en todas las etapas, que se tienen entonces que retirar antes de la formulación final del producto. Con respecto a la seguridad vírica del producto, lo que se debe garantizar para su uso clínico, el único proceso descrito que contiene una etapa única de inactivación vírica utiliza heptano para este fin (US 5.219.995): El intermediario secado por congelación se resuspende en m-heptano y se calienta a 60 °C durante 20 h, después el agente inactivador se retira secando el producto. Además de ser insuficiente en anticipación de uso clínico, el tratamiento de inactivación vírica descrito en dicha patente es potencialmente perjudicial para la integridad de la proteína de interés.

30 **[0020]** Esmon, C.T. et al (1979) Journal of Biological Chemistry 254(3):964-73, describen la purificación de FV utilizando dos etapas de intercambio aniónico como parte de un protocolo más elaborado, ambas en modo de captura.

35 **[0021]** En evidente por lo tanto que no hay actualmente un proceso de purificación de FV que sea simple, rápido y fácilmente escalable para la producción industrial que haga posible obtener una proteína intacta con un buen rendimiento.

40 **[0022]** El ámbito de la presente invención es por lo tanto proporcionar un método simple, aplicable a una escala industrial, que haga posible obtener un concentrado con inactivación vírica, purificado con un alto rendimiento, en el que la integridad de la proteína esté preservada tanto como sea posible, garantizando la seguridad vírica del producto y que sea adecuado para su uso clínico por administración parenteral.

Definiciones y abreviaturas

[0023]

45 FV: factor V
 FVa: factor V activado
 FXa: factor X activado
 APC: proteína C activado
 50 RICD: trastorno de coagulación heredado recesivamente
 SNC: sistema nervioso central
 FFP: plasma nuevo congelado
 rFVIIa: factor VII activado recombinante
 FEIBA: complejo de protrombina activado
 FVII: factor VII
 55 FII: factor II
 FIX: factor IX
 FX: factor X
 PTC: complejo de protrombina
 TnBP: tri-n-butyl fosfato
 60 DEAE: dietilaminoetilo
 DFP: diisopropil fluorofosfato
 PMSF: fluoruro de fenilmetanosulfonilo
 STI: inhibidor de tripsina de soja
 65 WFI: agua para inyección

Sumario de la invención

[0024] La presente invención describe un proceso de purificación del FV que se inicia a partir de plasma humano, o una fracción intermedia enriquecida en FV, en que la proteína está intacta, preferentemente criosobrenadante. Dicho proceso comprende dos etapas de cromatografía sobre intercambiadores aniónicos débiles, preferentemente que tienen grupos funcionales DEAE, en el que la primera etapa se lleva a cabo en modo de "no unión" mientras que la segunda es en modo "captura" de FV.

[0025] El proceso de acuerdo con la invención es fácilmente escalable a nivel industrial y hace posible obtener un concentrado de FV con alto rendimiento, que es víricamente seguro y tiene un nivel de purificación adecuado para su uso en el tratamiento de patologías asociadas con la deficiencia de FV, en particular parahemofilia y deficiencias asociadas de FV y FVIII, patologías que actualmente no tienen un tratamiento eficaz. La primera etapa de purificación se ha ideado con el fin de separar el FV de los otros factores de coagulación, particularmente FVII, FII, FIX y FX, una etapa que es fundamental para garantizar una integridad mayor de la proteína de interés. Dicha etapa consiste en una incubación discontinua de la resina y el criosobrenadante bajo tales condiciones de pH, conductividad y carga para permitir la unión de factores contaminantes a la resina y recuperar el FV en la fracción que no se absorbe; dicha fracción se obtiene por lo tanto por medio de un método de filtración simple que hace posible separar la resina del plasma filtrado. El producto intermedio producido de esta manera se somete a una segunda etapa de cromatografía ideada para unir el FV al intercambiador aniónico, eliminación de las proteínas contaminantes por medio de tampones de lavado, elución del FV por aumento de la fuerza iónica en el tampón de elución.

[0026] El presente método de la invención tiene las siguientes ventajas con respecto a lo que se ha descrito en las patentes y publicaciones mencionadas anteriormente:

- Es un método simple y fácilmente ejecutable, en el que por medio de solo dos etapas de cromatografía, hacen posible obtener un concentrado de FV purificado con buen rendimiento.
- A diferencia de lo que se ha comunicado en la bibliografía, el FV se separa de los factores del complejo de protrombina por medio de una etapa de purificación con poco procesamiento y bajo coste. Además, la etapa en cuestión consiste en una incubación discontinua del sobrenadante crio-agotado, preferentemente con resina Sephadex A50 DEAE, en que la conductividad del sobrenadante crio-agotado y la relación de volumen resina/muestra se han ajustado aproximadamente, de manera para identificar condiciones en las que el FV no se une y al mismo tiempo el FII, FVII, FIX y FX están unidos. Por otro lado, los trabajos patentados y publicados prevén obtener dicho resultado por medio de técnicas de precipitación, inactivando de alguna manera drástica y potencialmente una buena parte del FV presente, o por medio de técnicas de inmunoafinidad, que implican numerosas dificultades en la preparación del soporte de cromatografía y que es mucho más costosa en comparación con la que se comunica en la presente invención.
- La separación de FV de las proteínas componentes del PTC, una condición esencial para el mantenimiento de la integridad de la proteína, se produce durante la primera etapa del proceso de purificación; operando de esta manera evita la co-purificación del FV junto con los factores PTC mencionados anteriormente debido a la absorción en el soporte Sephadex A50 DEAE, que daría como resultado su activación y por lo tanto su inactivación posterior, como se muestra en el ejemplo 1.
- El presente método también hace posible que se pueda utilizar la fracción de complejo absorbido en la resina para la purificación de referencia del PTC, posiblemente incluso que contenga los 4 componentes, dado que no solamente el FII, FIX y FX se unen al soporte, sino que también el FVII se absorbe casi completamente en el mismo.

Breve descripción de las figuras

[0027]

La Figura 1 muestra el cuadro de una realización preferida del método de la invención, a partir del material bruto para conseguir el producto terminado que contiene el FV.

La Figura 2 muestra el perfil de fraccionamiento plasmático.

La Figura 3 muestra el análisis de transferencia de Western que se lleva a cabo sobre el producto terminado en comparación con referencias estándar con el fin de verificar la integridad del FV. 1. PM de referencia, 2. FV de referencia, 3. FVa de referencia, 4. Volumen FV 01; 5. Volumen FV 02.

Descripción detallada de la invención

[0028] De acuerdo con la presente invención, el FV se purifica comenzando a partir de plasma humano o a partir de un intermedio de fraccionamiento del mismo. De acuerdo con un aspecto particular y preferido, dicho material e inicio es criosobrenadante a saber, la fracción no sedimentada derivada de la etapa de crioprecipitación del plasma, seguida por centrifugación.

- 5 **[0029]** Preferentemente, el criosobrenadante se suplementa con inhibidores de proteasas, que se utilizan individualmente o como una asociación de los mismos, tales como, por ejemplo, Aprotinina, Benzamidina, Leupeptidina, y STI. En un aspecto preferido, se utiliza Aprotinina como inhibidor de proteasas único, ya que es suficiente para garantizar la integridad del FV en el producto final. El uso de aprotinina también tiene las siguientes ventajas: a pH 7,4 está cargado positivamente y por lo tanto no se une a los intercambiadores aniónicos, presumiblemente se eluye en la fracción no unida en la segunda etapa de cromatografía; posteriormente, como es una molécula pequeña, que se puede eliminar fácilmente por diálisis, se puede eliminar más tarde en la etapa de ultrafiltración.
- 10 **[0030]** La presente invención preferentemente prevé la inclusión de un tratamiento disolvente/detergente, tal como Tween 80/TnBP, entre las primera y segunda etapas de cromatografía: que contribuye además a la seguridad vírica del producto, posicionando la etapa de inactivación vírica a este nivel se hace posible reducir la concentración de ambos agentes inactivadores en el eluido que contiene FV. Además, estos tienden a no unirse al soporte de cromatografía de intercambio aniónico que se utiliza posteriormente, y por lo tanto se recupera la mayoría en la fracción no absorbida, mientras que el FV permanece unido a la resina y se eluye aumentando la fuerza iónica del tampón de equilibrado. El uso de tales agentes inactivadores incluidos en el nivel mencionado anteriormente del proceso de purificación permite ciertamente una mejoría en comparación con los que se comunica en la bibliografía; en los pocos casos en los que se prevé una etapa de inactivación vírica, se lleva a cabo utilizando heptano, que se retira luego por secado, un tratamiento que es potencialmente perjudicial para la integridad de la proteína (documento US 5.219.995).
- 15 **[0031]** Además del tratamiento con disolvente/detergente, se ha incluido una etapa de eliminación vírica corriente abajo de la segunda etapa de cromatografía, que implica la filtración a través de nanofiltros de 20 nanómetros. Esta etapa adicional también protege el producto contra los pequeños virus no encapsulados, tales como por ejemplo HAV. El proceso descrito termina con una etapa de ultracentrifugación que hace posible obtener una solución de proteína concentrada y dializada, adecuada para la administración i.v. para el tratamiento de la Parahemofilia.
- 20 **[0032]** De acuerdo con un aspecto preferido de la presente invención la muestra de criosobrenadante se suplementa con Aprotinina a una concentración comprendida entre 50 y 1100 KUI/ml, y luego se diluye con WFI para obtener un valor de conductividad comprendido entre 3 y 10 mS/Cm, y el pH se ajusta a un valor comprendido entre 7,0 y 8,0.
- 25 **[0033]** De acuerdo con la presente invención, la muestra así obtenida se incuba entonces de modo discontinuo a una temperatura comprendida entre 15 y 25 °, con resina Sephadex A50 DEAE seca o hidratada, en una relación que puede variar desde 0,15 a 2,0 g de resina seca por litro de muestra diluida, durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 y 90 minutos.
- 30 **[0034]** De acuerdo con la presente invención, la mezcla de muestra-resina se filtra en vacío a través de un embudo de Buchner o utilizando cápsulas desechables, por medio de pre-filtros K100 tipo Pall o similares. El FV se recubre casi por completo en el filtrado, mientras que el FII, FVII, FIX y FX se absorben predominantemente por la resina.
- 35 **[0035]** Por lo tanto la presente invención prevé la adición de cloruro cálcico, hasta una concentración comprendida entre 1 y 10 mM, y cloruro sódico, hasta una concentración comprendida entre 100 y 130 mM, a la muestra filtrada, llamado filtrado DEAE.
- 40 **[0036]** De acuerdo con la presente invención, la muestra tratada de esta manera se somete a incubación con Tween 80 a una concentración comprendida entre un 0,5 y un 2% p/p y tri-n-butyl-fosfato a una concentración comprendida entre un 0,1 y un 0,5% p/p a una temperatura comprendida entre 20 y 30 °C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 10 h.
- 45 **[0037]** De acuerdo con la presente invención, la solución sometida al tratamiento de inactivación vírica se filtra a través de filtros con un corte de 0,2 µm, con el fin de proteger el soporte de cromatografía que se utiliza posteriormente en el proceso de purificación.
- 50 **[0038]** De acuerdo con la presente invención, la solución inactivada en cuanto a virus se somete a cromatografía en columna, preferentemente sobre un intercambiador aniónico débil, tal como por ejemplo: Fractogel EMD-DEAE (Merck), DEAE Toyopearl 650 M (Tosoh), Macro-Prep DEAE (Bio Rad), DEAE Sepharosa FF (GE), DEAE Ceramic HyperD
- 55 **[0039]** F (Pall). De acuerdo con la presente invención, la segunda etapa de purificación por cromatografía se lleva a cabo en modo unión, y se caracteriza por aumentos posteriores de la concentración de sal permitiendo la eliminación secuencial de las proteínas no unidas al soporte durante la fase de lavado, la eliminación de proteínas contaminadas unidas débilmente durante las etapas intermedias, y la elución selectiva del FV a una mayor fuerza iónica (FV eluido).
- 60 **[0039]** F (Pall). De acuerdo con la presente invención, la segunda etapa de purificación por cromatografía se lleva a cabo en modo unión, y se caracteriza por aumentos posteriores de la concentración de sal permitiendo la eliminación secuencial de las proteínas no unidas al soporte durante la fase de lavado, la eliminación de proteínas contaminadas unidas débilmente durante las etapas intermedias, y la elución selectiva del FV a una mayor fuerza iónica (FV eluido).
- 65

[0040] De acuerdo con la presente invención, la segunda etapa de purificación por cromatografía preferentemente incluye las siguientes etapas:

- 5 a) acondicionamiento del intercambiador aniónico débil con tampón de equilibrio acuoso que tiene un pH comprendido entre 7,0 y 7,8, que contiene NaCl a una concentración comprendida entre 0,05 y 0,13 M, que contiene cloruro cálcico a una concentración comprendida entre 1 y 10 mM, y que comprende opcionalmente glicina.
- b) carga de la fracción enriquecida en FV;
- 10 c) elución de proteínas no unidas lavando con tampón de equilibrio;
- d) elución de proteínas unidas débilmente con un tampón acuoso a un pH comprendido entre 7,0 y 7,8 que contiene NaCl a una concentración comprendida entre 0,14 y 0,17 M, que contiene cloruro cálcico a una concentración comprendida entre 1 y 10 mM, y que comprende opcionalmente glicina;
- 15 e) elución de una solución que contiene FV con un tampón de elución acuoso a un pH comprendido entre 7,0 a 7,8 que contiene NaCl a una concentración comprendida entre 0,18 y 0,30 M, que contiene cloruro cálcico a una concentración comprendida entre 1 y 10 mM, y que comprende opcionalmente glicina.

[0041] Dicho tampón con un pH comprendido entre 7,0 y 7,8, se obtiene por ejemplo utilizando citrato, fosfato o Tris.

20 [0042] De acuerdo con la presente invención, el eluido que contiene FV se somete a eliminación vírica por medio de un proceso de filtración a través de filtros de 0,1 μm (por ejemplo, DJL-Pall) y nanofiltración, que se lleva a cabo utilizando nanofiltros de 50 y 20 nanómetros, tales como por ejemplo DV50 y DV20 (Pall) o N20 (Planova).

25 [0043] De acuerdo con la presente invención, la solución nanofiltrada, conocida como FV NF se concentra posteriormente y se dializa contra un tampón apropiado con el fin de obtener una solución con un título de FV de al menos 20 UI/ml, y una composición salina compatible con la administración intravenosa.

30 [0044] De acuerdo con la presente invención, el producto final obtenido de esta manera, conocido como FV en bruto, se congela y se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, una condición bajo la cual el FV contenido en la solución ha demostrado que es estable.

[0045] Este método puede utilizarse para obtener un concentrado de FV adecuado para la administración intravenosa del tratamiento de Parahemofilia u otras patologías asociadas con la deficiencia de FV.

35 [0046] Además de proporcionar un concentrado de FV purificado con alto rendimiento, el método de purificación de la presente invención es eficaz, reproducible, simple y escalable a nivel industrial. El concentrado que contienen FV con una alta actividad específica, si se compara con los métodos de purificación utilizando los métodos tradicionales y de bajo coste tal como intercambio iónico. Las proteínas contaminantes principales que pueden interferir con la estabilidad del producto final, tal como FII, FVII, FVIII, FIX y FX, están presentes solo en cantidades traza. Otros contaminantes tales como Fibrinógeno, Fibronectina e IgG están por debajo del límite de detección, mientras que la IgA e IgM están presentes a concentraciones muy bajas.

45 [0047] El FV purificado utilizando el presente método conserva su integridad, como se muestra por comparación con una referencia de plasma por medio del análisis de transferencia de Western.

[0048] La invención se describe además en los siguientes ejemplos. Dichos ejemplos son útiles para clarificar la invención y no la limitan de ninguna manera.

Sección experimental

50

Ejemplo 1: Evaluación de FV en productos intermedios del fraccionamiento

[0049] La actividad de FV se ha evaluado en varios productos intermedios del fraccionamiento por medio de un ensayo de coagulación, utilizando un plasma deficiente en FV disponible comercialmente (plasma deficiente en Factor V-IL) y tromboplastina (Recombiplastin2G-IL). El proceso de fraccionamiento examinado (Figura 2) comprende la etapa de crioprecipitación y absorción en el intercambio aniónico débil, antes de las etapas de fraccionamiento convencional utilizando etanol, para obtener albúmina e inmunoglobulinas.

60 [0050] El análisis de varios productos intermedios ha mostrado la partición de casi todos los FV en el criosobrenadante (aprox. un 98%); de estos, solamente el 17% de los FV incubados con resina de intercambio aniónico Sephadex A50 DEAE se recupera en la fracción no unida, indicando de esta manera que la mayoría del FV se une al soporte junto con los componentes del complejo de protrombina. Además, aprox. el 30% del FV incubado con el intercambio aniónico se eluye con el PTC, pero la proteína tiende a perder actividad rápidamente, como se demuestra por los análisis de dicha muestra tras el almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante unos pocos días (Tabla 1).

65

Tabla 1

Producto intermedio	% Rendimiento FV en la etapa
Sobrenadante sin crio	
PTC Sobrenadante	17,09
PTC bruto recién obtenido	29,58
PTC Bruto 7 días a -20 °C	5,31

5 [0051] Según se avanza la precipitación con etanol, la recuperación del FV tiende a reducirse, aunque no drásticamente, y su actividad específica (S.A. = UI/mg de proteína) permanece menor que la medida en el plasma (0,0145 UI/mg).

Ejemplo 2: proceso de purificación

a) Reparación del material de partida

10 [0052] Se ha utilizado el sobrenadante como material de partida. El pH de este producto intermedio se ajustó a un valor de 7,4 utilizando ácido clorhídrico, luego se suplementó la muestra con Aprotinina hasta una concentración de 1000 KUI/ml y se diluyó aproximadamente 3,36 veces con WFI para dar una conductividad final de 4,5 mS/cm.

b) Cromatografía de intercambio aniónico discontinua

15 [0053] Se llevó a cabo una cromatografía de no unión discontinua sobre resina de intercambio aniónico Sephadex A50 DEAE (GE Healthcare). Se añadió la resina seca Sephadex A50 DEAE al criosobrenadante, tratado como se ha descrito en la sección anterior, en una relación de 0,9 g de resina seca/ l de muestra diluida, con agitado mecánico constante. Se llevó a cabo la incubación a 25 °C durante 60 minutos. Al final de la incubación, la mezcla resina/muestra se filtró a través de un filtro de profundidad tipo K100 (Pall), que atrapaba la resina y la fracción adsorbida en el filtro, mientras que el material no adsorbido se recupera en el filtrado. Bajo las condiciones indicadas, era posible separar el FV de los factores componentes del complejo protrombina, como se presenta en la tabla 3:

Tabla 2

Etapa	% de rendimiento en la etapa					
	FV Act	FVII	FII	FIX	FX	Proteína
Filtrado DEAE	99,80%	16,03%	4,62%	n.d.*	15,77%	88,26%
*resultados por debajo del límite de detección del ensayo						

c) Inactivación vírica por mezcla de disolvente/detergente

30 [0054] La muestra filtrada se suplementó con cloruro sódico y cloruro cálcico, tal que la solución que se cargaba en la columna en la etapa de cromatografía posterior debería tener una concentración igual a 5 mM de cloruro cálcico y 120 mM de cloruro sódico. El producto intermedio tratado de esta manera se sometió a inactivación vírica poniéndolo en contacto con una mezcla de Tween 80 (1% p/p) y tri-n-butyl-fosfato (0,3% p/p) durante 8 h a una temperatura controlada de 25 ± 1 °C. La muestra que se sometió a inactivación vírica se clarificó por filtración a través de un filtro con 0,2 µm de corte como protección para la siguiente etapa de cromatografía.

d) Cromatografía en columna de intercambio aniónico

40 [0055] La cromatografía en columna de intercambio aniónico se llevó a cabo utilizando una resina compactada Fractogel EMD DEAE (Merck) en una columna con un diámetro de 5 cm y una altura de 17 cm. La columna se equilibró con 10 mM de tampón citrato, que contenía 120 mM de cloruro sódico, 5 mM de cloruro cálcico, 120 mM de glicina, pH 7,4, y una tasa de flujo de 180 cm/h.

45 [0056] La muestra inactivada y filtrada se cargó en la columna como una carga de 340 mg de proteína/ml de resina; a una tasa de flujo de 130 cm/h. Una vez completada la carga, la columna se lavó con 6 volúmenes de tampón de equilibrio a una tasa de flujo de 180 cm/h. Las proteínas unidas débilmente al soporte se eliminaron lavando con 6 volúmenes de columna de tampón de equilibrio en el que las concentraciones de cloruro sódico se aumentaron a 150 mM. El FV se eluyó entonces aumentando la concentración de cloruro sódico en el tampón de elución a 200 mM, lavando la columna con 5 volúmenes de dicho tampón a una tasa de flujo de 90 cm/h.

[0057] La Tabla 3 presenta las características de la solución que contiene el FV eluído de la columna de cromatografía de intercambio aniónico:

Tabla 3

Fracción	FV Act(UI/ml)	% Rendimiento en la etapa	Proteína (mg/ml)	% Rendimiento en la etapa	S.A. (UI/mg)
Eluído de Fractogel EMD-DEAE	3,670	100%	0,207	0,13%	17,729

5 e) Nanofiltración

[0058] El eluído de Fractogel EMD-DEAE primero se filtró todo a través de un filtro de grado esterilizante y posteriormente a través de un filtro de grado vírico con una porosidad de 20 nm. Los resultados obtenidos de este proceso se presentan en la tabla 4:

10

Tabla 4

Etapa	% Rendimiento en la etapa
Filtración esterilizante	92,31%
Filtración 20 nm	86,34%

d) Concentración/ultracentrifugación

15 **[0059]** La muestra nanofiltrada se sometió a ultracentrifugación por medio de un dispositivo para filtración de flujo tangencial utilizando casetes con un corte molecular de 50 KDa (Pall); la muestra se concentró de esta manera a un título mínimo de FV de 20 UI/ml y se dializó hasta alcanzar la formulación final deseada. Para la diálisis y las fases de formulación, se utilizó un tampón que contenía 10 mM de citrato sódico, 110 mM de cloruro sódico, 120 mM de glicina y 1 mM de cloruro cálcico a un pH de 7,4.

20

[0060] La solución final que se obtiene de esta manera se sometió a filtración esterilizante y se metió en viales, entonces posteriormente se congelaron a -20 °C.

25 **[0061]** El proceso descrito en el presente ejemplo hizo posible de esta manera obtener un concentrado de FV con altos rendimientos y un buen índice de purificación (PI) en comparación con el material de partida, como se muestra en la tabla 5:

Tabla 5

Fracción	% Rendimiento en la etapa	S.A. (UI/mg)	P.I
Volumen de FV	73,4%	20,33	782

30 **Ejemplo 3: caracterización del producto terminado**

[0062] Este ejemplo se muestra en una tabla (Tabla 6) que resumen las características principales del producto obtenido de la aplicación del protocolo descrito en el ejemplo 2.

35

Tabla 6

IgG (mg/ml)	n.d.*
FIB (mg/ml)	n.d.*
FNC (mg/ml)	n.d.*
IgM (mg/l)	0,084
IgA (mg/l)	0,007
FV Act (UI/ml)	24,91
FII (UI/ml)	0,01
FX (UI/ml)	0,03
FIX (UI/ml)	0,04
FVII (UI/ml)	0,04
Proteína C (UI/ml)	n.d.*

ES 2 547 425 T3

Proteína (mg/ml)	1,23
*resultados por debajo del límite de detección del ensayo	

5 **[0063]** En el producto final que se obtiene, también se evalúa la integridad de la proteína de interés por transferencia de western utilizando un anticuerpo dirigido contra la cadena pesada de FV. Los resultados de este ensayo se presenta en la figura 3. La integridad y la ausencia de activación de FV en el volumen final se muestran también ensayando factores activados: este ensayo, que detecta la presencia de fenómenos de activación de la cascada de coagulación, también dio un resultado negativo.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de purificación de FV que comienza a partir de plasma humano o una fracción intermedia enriquecida en FV, en el que la proteína está intacta; dicho proceso comprende dos etapas de cromatografía sobre intercambiadores aniónicos débiles, en el que la primera etapa se lleva a cabo en modo de “no unión”, para separar el FV de otros factores de coagulación mientras que la segunda etapa es en modo “captura” de FV; en el que ambos intercambiadores aniónicos débiles de las dos etapas de cromatografía pertenecen a la categoría de intercambiadores débiles que **se caracterizan por** el grupo funcional dietilaminoetilo (DEAE); en el que las dos etapas de cromatografía están separadas por al menos una etapa de inactivación vírica que se lleva a cabo por un tratamiento disolvente-detergente y en el que tras la segunda etapa de cromatografía, la solución que contiene el FV se somete a una etapa de eliminación vírica por nanofiltración.
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se utiliza criosobrenadante como material de partida.
3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el criosobrenadante se suplementa con inhibidores de proteasas, que se utilizan individualmente o en una asociación de los mismos, tales como, por ejemplo, Aprotinina, Benzamidina, Leupeptina, STI.
4. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la muestra de criosobrenadante se suplementa con Aprotinina a una concentración comprendida entre 50 y 1100 KUI/ml, y luego diluida con WFI para obtener un valor de conductividad comprendido entre 3 y 10 mS/Cm, y el pH ajustado a un valor entre 7,0 y 8,0.
5. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la matriz de intercambio aniónico débil utilizado en la primera etapa es de tipo Sephadex, es decir, basada en dextrano.
6. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la primera etapa de cromatografía se lleva a cabo en modo discontinuo, a una temperatura comprendida entre 15 y 25 °C, utilizando resina Sephadex A50 DEAE seca o hidratada, en una relación que puede variar desde 0,15 a 2,0 g de resina seca por litro de muestra diluida, durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 y 90 minutos.
7. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el que el intercambiador aniónico débil que se utiliza en la segunda etapa consiste en un soporte hidrófilo, sintético, con una estructura en “tentáculo” que contiene largas cadenas poliméricas, en cuyos extremos están unidos los grupos DEAE.
8. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la segunda etapa de cromatografía comprende las siguientes etapas:
- a) acondicionar la resina de intercambio iónico con tampón de equilibrio que tiene un pH comprendido entre 7,0 y 7,8, que contiene NaCl a una concentración comprendida entre 0,05 y 0,13 M, que contiene cloruro cálcico a una concentración comprendida entre 1 y 10 M, y que opcionalmente comprende glicina;
 - b) cargar la fracción enriquecida en proteínas de interés;
 - c) eluir las proteínas no unidas lavando con tampón de equilibrio;
 - d) eluir las proteínas unidas débilmente con un tampón acuoso a un pH comprendido entre 7,0 y 7,8, que contiene NaCl a una concentración comprendida entre 0,14 y 0,17 M, que contiene cloruro cálcico a una concentración comprendida entre 1 y 10 mM, y que opcionalmente comprende glicina;
 - e) eluir una solución que contiene FV con un tampón de elución a un pH comprendido entre 7,0 y 7,8, que contiene NaCl a una concentración comprendida entre 0,18 y 0,30 M, que contiene cloruro cálcico a una concentración comprendida entre 1 y 10 mM, y que opcionalmente comprende glicina;

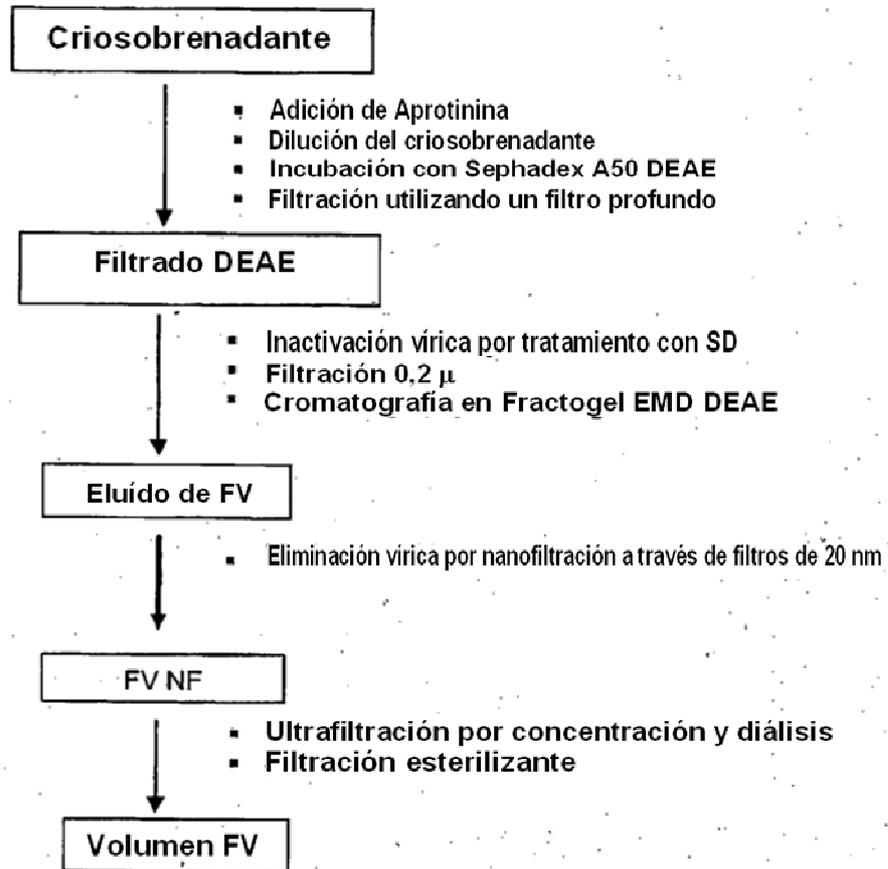


FIG. 1

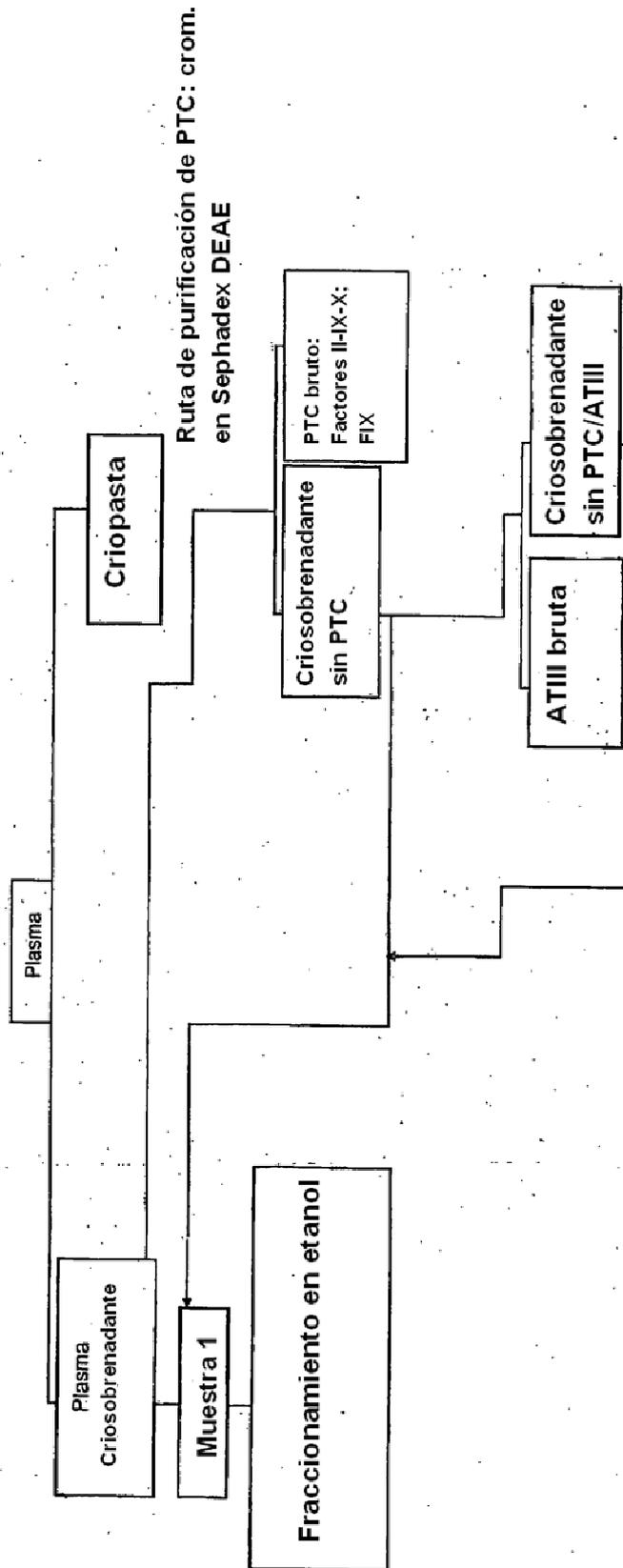


FIG. 2

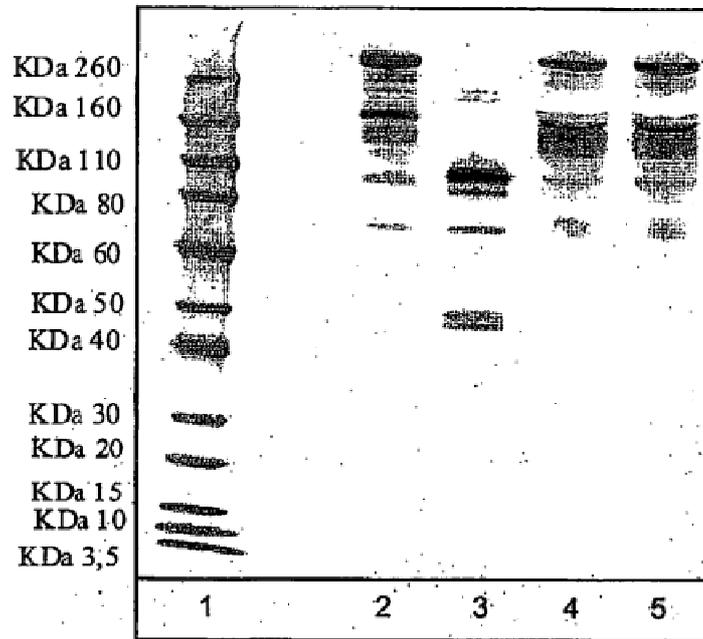


FIG. 3