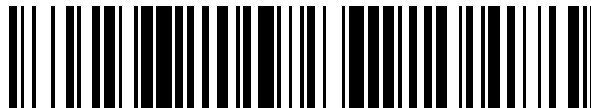


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 698**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/75** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2011 E 11757875 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 2619225**

54 Título: **Proceso para la producción de fibrinógeno**

30 Prioridad:

**21.09.2010 US 344719 P**  
**20.09.2010 EP 10177640**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.10.2016**

73 Titular/es:

**OCTAPHARMA AG (100.0%)**  
**Seidenstrasse 2**  
**8853 Lachen, CH**

72 Inventor/es:

**PAPE, RAINER;**  
**GEHRINGER, WERNER y**  
**SCHULZ, PETRA**

74 Agente/Representante:

**ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María**

**ES 2 586 698 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 producción de fibrinógeno

5 Antecedentes de la invención

- El fibrinógeno, también conocido como factor de coagulación I, tiene una función clave en la hemostasia y en la curación de las heridas. Es una glucoproteína sintetizada en el hígado con un peso molecular aparente de 340 000 Da; está compuesto por dos dímeros, cada uno de los cuales está formado por tres pares de cadenas polipeptídicas no idénticas denominadas A $\alpha$ , B $\beta$  y  $\gamma$  unidas por puentes disulfuro. Circula en el flujo sanguíneo a una concentración de aproximadamente 150 a 400  $\mu$ g/ml. Tras una lesión de los vasos sanguíneos, las plaquetas sanguíneas se activan y forman un tapón. El fibrinógeno está implicado en la homeostasia primaria mediante la adición de entrecruzamiento a las plaquetas activadas.
- 10
- 15 En paralelo se inicia la activación de la cascada de coagulación. Como punto final, el fibrinógeno se convierte en fibrina mediante la liberación proteolítica del fibrinopéptido A y, a una velocidad más lenta, del fibrinopéptido B mediante la trombina. Los monómeros solubles de fibrina se agrupan en fibrillas helicoidales de doble cadena. Posteriormente estas fibrillas se disponen de forma lateral, lo que da lugar a fibras más gruesas. A continuación, estas fibras se entrecruzan mediante el factor FXIIIa para obtener una red de fibrina que estabiliza el tapón de
- 20 plaquetas mediante interacciones de la fibrina con plaquetas activadas, lo que da lugar a un coágulo estable.

Enfermedades y deficiencias

- La afibrinogenemia congénita es un trastorno hemorrágico raro, en el que los pacientes sufren una coagulación de la sangre inadecua debido a la carencia o funcionamiento defectuoso del fibrinógeno. Esta enfermedad podría llevar a episodios hemorrágicos espontáneos o a sangrado excesivo tras un traumatismo menor o durante los procedimientos intervencionistas.
- 25

- Las deficiencias adquiridas en fibrinógeno son mucho menos frecuentes que la afibrinogenemia congénita y pueden estar inducidas por hemodilución u otros acontecimientos como pérdidas de sangre durante la cirugía, traumatismos, coagulación intravascular diseminada (CID) o septicemia.
- 30

- Las deficiencias de fibrinógeno pueden corregirse hasta niveles normales de fibrinógeno en plasma de aproximadamente 1,5 a 3 g/l mediante terapia de sustitución con infusión intravenosa de plasma fresco congelado o crioprecipitado. No obstante, estos tratamientos se ven afectados por el riesgo de introducir patógenos, por ejemplo, virus o priones, en un paciente y generar de este modo trastornos adicionales. Por tanto, es conveniente aplicar por vía intravenosa composiciones de fibrinógeno inactivadas para reestablecer el fibrinógeno a niveles fisiológicos de forma segura.
- 35

- Aunque existe fibrinógeno en las preparaciones denominadas pegamentos de fibrina, adhesivo de fibrinógeno, pegamiento tisular y similares, estas preparaciones están pensadas para uso tópico como polvos, pastas, espumas o en combinación con tejidos como parches sobre las heridas, y no pueden utilizarse para aplicación intravenosa ya que su consistencia y composición podrían iniciar inmediatamente acontecimientos trombocíticos durante su inyección. Estas preparaciones adicionalmente contienen trombina, sales de calcio y cantidades relativamente altas de factor de coagulación XIII. Aparecen ejemplos de dichas preparaciones en los documentos US-A1-2008/003272, WO-A-95/22316 o US-A1-2008/181878.
- 40
- 45

- Se conocen procesos de producción de fibrinógeno a partir del documento EP-B1-1 240 200 en el que se hace referencia a un procedimiento de purificación de fibrinógeno a partir de una solución que contiene fibrinógeno, que comprende la aplicación de una solución que contiene fibrinógeno a una matriz de intercambio iónico, en condiciones tales que el fibrinógeno se une a la matriz, el lavado de la matriz de intercambio iónico con una solución tampón que contiene al menos un aminoácido  $\omega$ , la elución del fibrinógeno a partir de la matriz con un tampón compuesto por Tris 10 mM, citrato 10 mM, sacarosa 45 mM y NaCl a una concentración de 200 mM a 1,0 M, y la recuperación opcional del fibrinógeno del eluido.
- 50

- 55 En el documento EP-B1-0 771 324 se hace referencia a un proceso de producción de un concentrado de fibrinógeno libre de virus que se obtiene sometiendo a una fracción plasmática solubilizada que contiene fibrinógeno a un tratamiento químico de inactivación vírica, es decir, un tratamiento S/D o solvente/detergente, sometiendo a la fracción inactivada en virus resultante a precipitación en una solución que contiene un aminoácido a pH ácido para

obtener un sobrenadante, filtrando el sobrenadante para obtener un concentrado de fibrinógeno purificado y recuperando el concentrado de fibrinógeno purificado. El concentrado de fibrinógeno recuperado se somete a radiación ultravioleta para una segunda inactivación vírica. El producto se estabiliza y liofiliza antes de una tercera inactivación vírica.

5

En el documento EP-B1-1 519 944 se muestra el uso de una matriz cromatográfica de afinidad de iones metálicos inmovilizados en condiciones en las que el fibrinógeno y el plasminógeno se unen a la matriz y, selectivamente, se eluye el fibrinógeno y el 93% del plasminógeno independientemente a partir de la matriz.

10 En el documento EP-B1-0 555 135 se describe un procedimiento para la producción de un fibrinógeno aplicable por vía intravenosa mediante la purificación de una solución de fibrinógeno sobre un gel de intercambio aniónico a base de agarosa entrecruzada que contiene grupos amina cuaternaria. Se dice que el fibrinógeno producido está libre de factor VIIIc.

15 En el documento EP-B1-1 457 497 se hace referencia a un proceso para la eliminación de virus en soluciones de fibrinógeno caracterizada por la estabilización y congelación de la solución y su posterior descongelación. La separación de los materiales no disueltos se produce antes de la dilución de la proteína y va seguida de nanofiltración de la solución resultante usando filtros de un tamaño de poro menor de 35 nm.

20 En el documento US-A1-2006/0009376 también se describe un procedimiento para la fabricación de fibrinógeno. A continuación se realiza una disolución y precipitación repetidas del fibrinógeno para eliminar el factor XIII.

Goheen, S. C. y col., publican en Journal of Chromatograph A. 816 (1998) 89-96, sobre cromatografía de intercambio iónico mediante HPLC de las proteínas plasmáticas albúmina, fibrinógeno e inmunoglobulina (G) sobre

25 materiales de columna no porosos que contiene grupos amina cuaternaria o sulfopropilo funcionales [véase la página 3a].

#### Resumen de la invención

30 Un objeto de la invención es proporcionar un concentrado de fibrinógeno fabricado con etapas específicas de eliminación y/o inactivación de patógenos en el proceso de producción para superar las reacciones adversas o el desarrollo de enfermedades relacionadas con patógenos. Dichos patógenos se seleccionan entre los grupos de bacterias, virus y priones, como la proteína priónica infectiva (PrP<sup>sc</sup>). La aplicación sistémica de dicho producto de fibrinógeno a través de la vía intravenosa permite el tratamiento de la afibrinogenemia congénita y de las deficiencias

35 de fibrinógeno adquiridas. La aplicación de este concentrado de fibrinógeno estandarizado permite un tratamiento rápido en situaciones de urgencia sin la laboriosa descongelación del plasma fresco congelado y una carga de volumen reducida, así como propiedades de coagulación estables debido a una composición esencialmente constante.

40 En el documento US 6 037 457 se describen procedimientos de producción de fibrinógeno recombinante en un sistema de cultivo de células de mamífero prolongado. Se describe un procedimiento para la producción de fibrinógeno recombinante que comprende: crecer células de mamífero que expresan fibrinógeno recombinante en un medio sin suero durante un tiempo de al menos un mes a un nivel de al menos 5 µg/ml; y a continuación recoger porciones del medio condicionado al menos dos veces durante el tiempo de cultivo de al menos un mes;

45 conteniendo cada porción al menos 5 µg/ml de fibrinógeno recombinante. También se describe un procedimiento para la producción de fibrinógeno recombinante que comprende: crecer células de mamífero que expresan fibrinógeno recombinante en un medio sin suero a un nivel superior a 1 µg/ml; recoger al menos una porción de medio condicionado y, a continuación, purificar el fibrinógeno a partir del medio mediante cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de afinidad. En algunas realizaciones, el medio se concentra antes de la etapa

50 de purificación del fibrinógeno. En realizaciones alternativas, tanto las etapas de concentración como las de purificación se realizan en presencia de al menos un inhibidor de proteasas.

Un objeto adicional de esta solicitud es proporcionar un proceso para la fabricación de un concentrado a nivel industrial; es decir, varios cientos a miles de litros de material de partida, como sangre o plasma sanguíneo, aunque

55 también es posible la producción a pequeña escala, es decir, algunos decilitros a varios litros.

Estos y otros objetos se consiguen mediante el proceso de las reivindicaciones 1 a 12 y un producto que se obtiene mediante el proceso de la invención según se reivindica en las reivindicaciones 13 y 14.

En general, se describe un proceso para la purificación o fabricación de fibrinógeno a partir de fuentes que contienen fibrinógeno que comprende las etapas de:

- formar un precipitado enriquecido en fibrinógeno añadiendo al menos un agente de precipitación a la fuente que  
5 contiene fibrinógeno;
  - opcionalmente aislar el precipitado enriquecido en fibrinógeno, por ejemplo, mediante centrifugación de dicho precipitado;
  - recoger el precipitado enriquecido en fibrinógeno en un medio acuoso formando una solución que contiene fibrinógeno, seguido opcionalmente de filtración y/o ultra/diafiltración;
  - 10 - someter la solución que contiene fibrinógeno a cromatografía en fase estacionaria con grupos de intercambio aniónico fuertes poniendo en contacto dicha solución con dicha fase en condiciones en las que el fibrinógeno se une a dicha fase;
  - seguido de una elución del fibrinógeno de la fase estacionaria mediante una solución acuosa con una fuerza iónica superior a la fuerza iónica de la etapa anterior, lo que produce una fracción enriquecida en fibrinógeno que se  
15 recoge;
  - opcionalmente seguido de etapas posteriores de dilución y/o concentración de la fracción enriquecida en fibrinógeno;
  - y opcionalmente distribuir la fracción enriquecida en fibrinógeno en viales adecuados.
- 20 En una realización del proceso de fabricación de la invención la fuente que contiene fibrinógeno se selecciona a partir del grupo compuesto por plasma sanguíneo, fracciones de plasma, como la fracción I, o crioprecipitado, cultivos celulares que producen fibrinógeno y/o sobrenadantes de dichos cultivos celulares. Si no se utiliza el crioprecipitado como material de partida, se produce un producto intermedio que contiene fibrinógeno como material de partida mediante procedimientos bien conocidos descritos por Cohn, Kistler-Nitschmann y modificaciones de los  
25 mismos.

Para obtener un producto farmacéuticamente útil es ventajoso que la fuente que contiene fibrinógeno se someta a un proceso de inactivación vírica, por ejemplo, un proceso solvente detergente.

- 30 Según otra realización de la invención la inactivación vírica se realiza antes de obtener un precipitado enriquecido en fibrinógeno. No obstante, también es posible realizar la inactivación vírica en una etapa diferente.

Según la invención, la eliminación de las sustancias inactivadoras de virus se realiza mediante extracción de aceite y/o cromatografía con intercambiadores iónicos fuertes.

- 35 Un agente de precipitación típico para su uso en el proceso de fabricación de la invención se selecciona a partir del grupo compuesto por aminoácidos como glicina, concentraciones altas de sales (desalado) o polietilenglicol.

- 40 Según aún otra realización de la invención el material obtenido se resuspende a partir de una pasta en un tampón con un pH de 7,5 a 8,5.

Según una realización adicional de la invención la fase estacionaria tiene grupos amino terciario o cuaternario.

- 45 Las etapas cromatográficas del proceso de fabricación de la invención pueden realizarse, en particular, en una columna.

Típicamente, la forma de conservación de la fracción enriquecida en fibrinógeno para relleno de viales está en estado líquido, en estado congelado, preferiblemente a  $< -15^{\circ}\text{C}$ , más preferiblemente por debajo de  $-30^{\circ}\text{C}$ , o como un liofilizado.

- 50 El tema de la presente invención también es una fracción enriquecida en fibrinógeno que se obtiene según el proceso de fabricación de la invención. La fracción enriquecida en fibrinógeno de la invención contiene, por ejemplo, de 0,01 a 9,0 ng de fibrinopéptido A por mg de fibrinógeno. La fracción enriquecida en fibrinógeno de la invención contiene además de 0,80 a 1,10 mg de antígeno de fibrinógeno por mg de fibrinógeno, determinado mediante el  
55 método de Clauss; actividad VWF:Ag  $< 0,1$  UI por mg de fibrinógeno; actividad de factor de coagulación XIII  $\geq 0,07$  UI por mg de fibrinógeno; de 0,01 a 1,00  $\mu\text{g}$  de fibronectina por mg de fibrinógeno y menos de 0,03 UI de trombina por mg de fibrinógeno.

El concentrado de fibrinógeno se distribuye en recipientes finales tras su esterilización mediante filtración y puede

conservarse en forma líquida, congelado como líquido o liofilizado.

El fibrinógeno producido según este proceso se caracteriza por cantidades muy bajas de impurezas lo que verifica el estado natural del producto y permite el tratamiento prolongado de las personas que lo necesiten. Preferiblemente, el FXIII está a la concentración contenida, ya que mantiene la estabilización de la fibrina formada, al tiempo que se evita la sobrecarga de esta transglutaminasa.

El término “comprendiendo”, “comprende” o “comprendido” también puede sustituirse por “consistiendo”, “consiste” o “consistido” sin alterar el descubrimiento de la descripción.

10

#### Descripción detallada

Aunque en principio pueden usarse todas las fuentes que contienen fibrinógeno según la invención, la fuente preferida es el crioprecipitado y, en adelante, el crioprecipitado sirve como fuente típica de fibrinógeno en la descripción adicional del proceso de fabricación de la invención.

15

Típicamente, el crioprecipitado se reconstituye o solubiliza en condiciones adecuadas de tampón en especial aproximadamente a pH neutro (6,9-7,0 por ejemplo en una solución tampón que contiene citrato sódico y NaCl), se somete a adsorción en particular con  $Al(OH)_3$  y se elimina el gel resultante, por ejemplo, mediante centrifugación. A continuación, pueden inactivarse los virus en el sobrenadante por ejemplo, mediante tratamiento solvente/detergente (S/D). Este procedimiento es bien conocido por los expertos en la materia y se describió originalmente en el documento EP-A-131 740. Los compuestos S/D como el Tritón (O-[4-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenoxi]polietoxietanol) y TnBP (Tri-n-butyl-fosfato) se eliminan en particular mediante extracción con aceite de ricino. Para una purificación adicional, la fase acuosa puede someterse a un proceso cromatográfico. Típicamente, esto puede realizarse poniendo en contacto la fase acuosa con un gel de intercambio iónico fuerte, el tri-metil-amino-etilo (TMAE) insertado sobre material de matriz, como Fractogel<sup>®</sup> EMD-TMAE. Se obtienen buenos resultados si se realiza la cromatografía con tampones con un valor de pH de 6,9 a 7,1 y una osmolalidad de 570 a 610 mOsmol/l. En estas condiciones el fibrinógeno no se une a la fase estacionaria y, por tanto, se encuentra en el flujo de paso o en el sobrenadante, en este último si se realiza un proceso de cromatografía en tándem.

30

La solución de fibrinógeno no unido, que contiene típicamente aproximadamente 40 g/l (método turbidimétrico de Clauss) se ajusta a pH= 7,0-8,0, en especial a pH = 7,3-7,5. Tras la adición de un agente de precipitación adecuado, por ejemplo, glicina, a una concentración de 0,8 a 12 M, en particular, de 0,9 a 1,1 M, la solución resultante puede estar durante 60 a 120 min para que precipite el fibrinógeno. El precipitado que contiene fibrinógeno, a continuación, puede separarse mediante centrifugación y esta pasta intermedia de fibrinógeno puede conservarse a  $\leq -70^\circ C$ , preferiblemente de  $-100^\circ C$  a  $-70^\circ C$ , durante hasta un mes. Ya en una única precipitación, por ejemplo con glicina, se obtiene una pasta de fibrinógeno suficientemente pura para su procesamiento adicional.

35

El producto intermedio preparado de este modo puede resuspenderse en un tampón Tris de 10 a 30 mM (pH = 7,5 a 8,5), en particular un tampón Tris de 15 a 25 mM con pH = 7,5 a 8,5. La suspensión obtenida puede filtrarse a continuación y someterse a ultra/diafiltración por ejemplo frente a 5 veces el volumen de suspensión del mismo tampón o de un tampón diferente.

40

La solución que contiene fibrinógeno resultante se carga a continuación en un gel de intercambio iónico fuerte seleccionado preferiblemente a partir de un grupo de grupos de amino terciario o cuaternario como ligandos insertados en una matriz. Dichos grupos funcionales se seleccionan a partir de los grupos bien conocidos dietil-amino-etilo (DEAE), tri-metil-amino, tri-metil-amino-etilo (TMAE) y otros grupos en los que el material vehículo puede estar compuesto por celulosa, agarosa, sílice, material polimérico o cerámico. Se consiguen buenos resultados, en particular en la reducción de fibronectina y vitronectina, con grupos trimetil-amino unidos a un polímero de metacrilato hidroxilado a través de un grupo de enlace como GigaCap Q-650M<sup>®</sup>. Esto es muy sorprendente ya que el químicamente similar Marco-Prep High Q<sup>®</sup>, un copolímero de metacrilato compuesto por dietileno-glicol-dimetacrilato/glicidil-metacrilato también con ligandos trimetil-amino pero con pérdida de la funcionalidad hidroxilo en su esqueleto polimérico, es menos eficaz en la reducción de dichas dos proteínas. La reducción eficaz de la fibronectina pegada es muy ventajosa para filtraciones opcionales, como ultra/diafiltración o nanofiltración, ya que aumenta el tiempo de vida de los filtros debido a la reducción de la obstrucción. Si se pretende que el proceso influya nanofiltración, se prefiere realizar el proceso con una solución diluida (concentración de fibrinógeno de aproximadamente 2 g/l), en particular con una cascada de nanofiltros. El gel o la resina cromatográfica, en particular, se preequilibra con el mismo tampón utilizado para resuspender la pasta de fibrinógeno intermedia antes de aplicar la solución de fibrinógeno. Las sustancias débilmente unidas se eliminan mediante lavado con tampón de equilibrado

50

55

seguido de tampón de lavado (1,5 g/l de citrato sódico, 6,0 g/l de cloruro sódico, ajustado a pH = 6,8 a 7,2, preferiblemente de 6,9 a 7,1 y con una conductividad de 11,0 a 13,0 mS/cm a una temperatura ambiente de 20 a 25°C.

- 5 A continuación, el fibrinógeno puede eluirse de la columna cromatográfica con un tampón de elución que contiene 1,5 g/l de citrato sódico y 10,0 g/l de glicina en particular ajustado al mismo intervalo de pH que el tampón de lavado, por ejemplo, mediante HCl y/o NaOH y ajustado con aproximadamente 7,0 g/l de NaCl a una conductividad de 13,1 a 15 mS/cm a temperatura ambiente de 20 a 25°C. Se recupera en el eluido aproximadamente el 74% del fibrinógeno aplicado a la columna, mientras que se elimina prácticamente por completo la fibronectina del eluido que  
10 contiene fibrinógeno.

Esta solución de fibrinógeno filtrada puede concentrarse adicionalmente mediante ultra/diafiltración hasta aproximadamente de 20 a 26 g/l y se esteriliza mediante filtración con membranas de  $\leq 0,2 \mu\text{m}$  de tamaño de poro nominal. Los expertos en la materia saben que también pueden conseguirse otras concentraciones, como de 1 a  
15 19,9 g/l o de 26,01 a 30 g/l, o incluso más altas. El concentrado de fibrinógeno de la presente invención también puede formularse con adyuvantes y estabilizantes conocidos por los expertos en la materia como hidratos de carbono, por ejemplo, sacarosa, trehalosa, aminoácidos, por ejemplo, glicina, histidina, alanina, arginina y detergentes, por ejemplo, poli-oxietilen-(20)-sorbitan-monoleato (TWEEN 80<sup>®</sup>). Este material a granel esterilizado por filtración se conserva opcionalmente durante hasta 5 días a -70°C o inferior, en particular, a de -70°C a -80°C, antes  
20 de esterilizarse por filtración por segunda vez y distribuirse en recipientes finales y, opcionalmente, liofilizarse o directamente distribuirse en los recipientes finales y, opcionalmente, liofilizarse sin una segunda esterilización por filtración.

No es necesario añadir tampones, estabilizantes, adyuvantes u otros compuestos adicionales, como factor de  
25 coagulación XIII (F XIII). El factor de coagulación XIII está presente en el concentrado con actividades  $\geq 0,05$  UI por mg de fibrinógeno (método de Clauss), en particular, de 0,07 a 0,3 UI por mg de fibrinógeno, de 0,06 a 0,5 UI por mg de fibrinógeno, o de 0,05 a 1 UI por mg de fibrinógeno.

El concentrado de fibrinógeno producido según el proceso presentado muestra su estado natural a través de una  
30 relación fibrinógeno-antígeno/fibrinógeno-Clauss de 0,80 a 1,10 en particular de 0,85 a 1,05, o de 0,90 a 1,00; un contenido de fibrinopéptido A de 0,01 a 9,0 ng por mg de fibrinógeno (método de Clauss), en particular de 0,05 a 8,0 ng por mg de fibrinógeno o de 0,08 a 6,0 ng por mg de fibrinógeno; una actividad VWF:Ag de  $< 0,1$  UI por mg de fibrinógeno (método de Clauss), en particular de 0,001 a 0,09 UI por mg de fibrinógeno, de 0,002 a 0,07 UI por mg de fibrinógeno, o de 0,002 a 0,04 UI por mg de fibrinógeno; una actividad de factor XIII  $\geq 0,07$  UI por mg de  
35 fibrinógeno (método de Clauss), en particular de 0,07 a 0,3 UI por mg de fibrinógeno, de 0,08 a 0,5 UI por mg de fibrinógeno, o de 0,07 a 1 UI por mg de fibrinógeno; un contenido de fibronectina de 0,01 a 1,00  $\mu\text{g}$  por mg de fibrinógeno (método de Clauss), en particular de 0,03 a 0,70  $\mu\text{g}$  por mg de fibrinógeno o de 0,05 a 0,40  $\mu\text{g}$  por mg de fibrinógeno; y una actividad de plasminógeno de 1 a 11 mUI por mg de fibrinógeno. Se determinó que la actividad trombina era inferior al límite detectable de 0,15 UI/ml para todas las determinaciones y a las mismas  
40 concentraciones de fibrinógeno que las presentadas en la tabla 1, la cual es equivalente a menos de 0,007 UI por mg de fibrinógeno o de 0,0069 a 0,0001 UI/mg.

La invención se explica adicionalmente mediante el siguiente ejemplo no limitante.

#### 45 Ejemplo

El crioprecipitado, producido a partir de plasma mediante procedimientos estabilizados, se reconstituyó o solubilizó por encima de pH neutro, se sometió a adsorción con  $\text{Al}(\text{OH})_3$  y el gel resultante se eliminó mediante centrifugación. A continuación, el sobrenadante se trató para inactivar los virus mediante tratamiento solvente/detergente (S/D). Los  
50 compuestos S/D, Tritón y TnBP se extrajeron con aceite vegetal y la fase acuosa se puso en contacto con Fractogel<sup>®</sup> EMD-TMAE. Se emplearon condiciones cromatográficas (valor de pH de 6,9 a 7,1 y una osmolalidad de 570 a 610 mOsmol/l) con las cuales el fibrinógeno no se unía al gel y, por tanto, se encontraba en el flujo de paso o en el sobrenadante.

55 La solución de fibrinógeno no unido se agitó durante aproximadamente 90 minutos tras la adición de glicina (1 mol/l de concentración final y pH = 7,4) para precipitar el fibrinógeno.

El precipitado que contenía fibrinógeno se separó a continuación mediante centrifugación, rindiendo una pasta intermedia de fibrinógeno.

El compuesto intermedio preparado de este modo se resuspendió en tampón Tris 20 mM (pH = aproximadamente 8,0). La suspensión obtenida se filtró a continuación y se sometió a ultra/diafiltración.

- 5 La solución que contenía fibrinógeno resultante se cargó a continuación en GigaCap Q-650M® y el gel o resina cromatográfica se preequilibró con el mismo tampón Tris utilizado para la resuspensión antes de aplicar la solución de fibrinógeno. Las sustancias débilmente unidas se eliminaron lavando con el tampón de equilibrado seguido de lavado con un tampón de lavado (1,5 g/l de citrato sódico, 6,0 g/l de cloruro sódico, ajustado aproximadamente a pH = 7,0 y una conductividad de aproximadamente 12,0 mS/cm). A continuación, el fibrinógeno se eluyó de la columna cromatográfica con un tampón de elución (1,5 g/l de citrato sódico y 10,0 g/l de glicina ajustado al mismo pH que el tampón de lavado y ajustado con aproximadamente 7,0 g/l de NaCl a una conductividad de 13,1 a 15 mS/cm).

- 15 La solución de fibrinógeno resultante se concentró, formuló y esterilizó mediante filtración. Esta solución a granel esterilizada mediante filtración se conservó durante 5 días a -80°C antes de esterilizarse mediante filtración una segunda vez y se distribuyó en los recipientes finales. Una parte de los recipientes finales se liofilizaron mientras que otra parte se mantuvo como formulación líquida.

- 20 Se analizaron los productos de cuatro ensayos de producción diferentes tras la reconstitución del producto liofilizado. La reconstitución de los liofilizados se consiguió mediante la adición de agua para inyección (API) hasta la concentración previa a la liofilización. Todos los ensayos de producción se realizaron esencialmente de la misma forma que se presenta en el ejemplo. Los resultados se presentan en la tabla 1.

N.º de ensayo	1	2	3	4	Intervalo
Fibrinógeno según Clauss (turbidimétrico) [mg/ml]	22,1	22,6	25,0	25,0	22,1-25,0
Antígeno de Fibrinógeno [mg/ml]	20,7	19,1	22,0	23,0	19,1-23,0
F XIII [UI/ml]	2,9	2,5	2,4	2,6	2,4-2,9
VWF:Ag [UI/ml]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Fibronectina [µg/ml]	3,3	4,9	4,5	3,8	3,3-4,9
Fibrinopéptido A [ng/ml]	36	20	10	11	10-36

Tabla 1

25

En la tabla 2 se presenta la normalización de los valores medidos mediante el cálculo del contenido o la actividad por mg de fibrinógeno, determinado mediante el método de Clauss.

N.º de ensayo	1	2	3	4	Intervalo
Fibrinógeno según Clauss [mg/ml]	22,1	22,6	25,0	25,0	22,1-25,0
mg de antígeno de Fibrinógeno /mg Fibr.-Clauss	0,937	0,845	0,880	0,920	0,845-0,937
UI de F XIII/mg Fibr.-Clauss	0,131	0,111	0,096	0,104	0,096-0,131
UI de VWF:Ag/mg de Fibr.-Clauss	0,005	0,004	0,004	0,004	0,004-0,005
µg de Fibronectina/mg de Fibr.-Clauss	0,149	0,217	0,180	0,152	0,149-0,217
ng de Fibrinopéptido A/mg de Fibr.-Clauss	1,629	0,885	0,400	0,440	0,400-1,629

30 Tabla 2

Comparación con productos comerciales.

- 35 En la tabla 3 se muestran los valores medidos de concentrados de fibrinógeno disponibles en el mercado. Todos los productos eran productos liofilizados y se reconstituyeron según las directrices del fabricante. También se muestra el intervalo de valores de los ensayos 1 a 4 según la presente invención como ya se ha mostrado en la tabla 1.

	Producto 1	Producto 2	Producto 3	Inventón actual
Fibrinógeno según Clauss (turbidimétrico) [mg/ml]	11,5	9,8	23,7	22,1-25,0
Antígeno de Fibrinógeno [mg/ml]	16,3	19,1	21,0	19,1-23,0
F XIII [UI/ml]	<0,2	<0,2	1	2,4-2,9
VWF:Ag [UI/ml]	14	1,3	3,8	0,1
Fibronectina [µg/ml]	13,3	258,9	944,3	3,3-4,9
Fibrinopéptido A [ng/ml]	130	1843	814	10-36

Tabla 3

En la tabla 4 se presenta la normalización de los valores medidos de productos disponibles en el mercado mediante el cálculo del contenido o actividad por mg de fibrinógeno, determinado mediante el método de Clauss. También se muestra el intervalo de valores de los ensayos 1 a 4 según la presente invención como también se muestra en la tabla 2.

	Producto 1	Producto 2	Producto 3	Inventón actual
Fibrinógeno según Clauss (turbidimétrico) [mg/ml]	11,5	9,8	23,7	22,1-25,0
mg de antígeno de Fibrinógeno/mg Fibr.-Clauss	1,417	1,949	0,886	0,845-0,937
UI de F XIII/mg Fibr.-Clauss	<0,017	<0,020	0,042	0,096-0,131
UI de VWF:Ag/mg de Fibr.-Clauss	1,217	0,133	0,160	0,004-0,005
µg de Fibronectina/mg de Fibr.-Clauss	1,157	26,418	39,844	0,149-0,217
ng de Fibrinopéptido A/mg de Fibr.-Clauss	11,304	188,061	34,346	0,400-1,629

10 Tabla 4

Comparación con una realización preferida del documento WO 01/48016.

Se extrajo 1 g de pasta de la fracción I con 8,33 g de tampón de extracción (NaCl 0,8 M,  $\epsilon$ -ACA 5 mM (ácido épsilon-aminocaproico), citrato sódico 20 mM, heparina a 60 UI/ml y pH = 7,3, es decir, el tampón del párrafo 1.1.19 mejorado) a 37 °C durante 2 horas. Se añadieron 50 g de una solución de hidróxido de aluminio al 2% (alhidrogel) al sobrenadante de la extracción. La mezcla se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos y se descartó el sedimento. El sobrenadante del alhidrogel y un tampón de Glicina/NaCl (glicina 2,1 M, citrato sódico 20 mM, NaCl 3,6 M y CaCl<sub>2</sub> 2,4 mM) se llevaron a 30,2 °C y 29,7 °C, respectivamente, y se añadió el sobrenadante al tampón durante 4,5 minutos. La mezcla de 1 parte de sobrenadante y 2,05 partes de tampón se agitó durante 20 minutos a 30,2-31,1 °C y, a continuación, se centrifugó durante 10 minutos a 5000 g. El precipitado de Gly/NaCl se redisolvió en tampón D, lo que representaba 1/3 del volumen del sobrenadante de la fracción 1 de extracción de la pasta a aproximadamente 21 °C con agitación continua durante 2 horas. El precipitado redisoluelto se trató a continuación con el procedimiento S/D con Polisorbato 80 y TnBP durante 1 hora a concentraciones del 1% (polisorbato 80) y 0,3 % (TnBP) a aproximadamente 23 °C. La cromatografía de intercambio aniónico se realizó con resina MacroPrep<sup>®</sup> HQ en una columna XK26 y una altura de lecho de aproximadamente 20 cm que representaba una columna de aproximadamente 100 ml a un caudal de 10 ml/min. El equilibrado se llevó a cabo con 2 volúmenes de columna de tampón MQ mejorado (TRIS 50 mM, NaCl 100 mM,  $\epsilon$ -ACA 20 mM a pH = 8,0, párrafo 2.2.3) y una conductividad (tras la columna) que alcanzaba los límites de conductividad +/- 10% del tampón MQ. Tras lavar con 6 volúmenes de columna de tampón MQ, el fibrinógeno se eluyó en un único pico con el tampón ME mejorado (NaCl 500 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,1 mM, citrato sódico 10 mM, Tris 10 mM y sacarosa 45 mM a pH = 7,0, es decir tampón D + 2x200 mM de NaCl).

Los resultados analíticos se presentan en la tabla 5.

35

	Documento WO 01/48016	Inventón actual
Fibrinógeno según Clauss (turbidimétrico) [mg/ml]	5,90	22,1-25,0
mg de antígeno de Fibrinógeno/mg Fibr.-Clauss	0,845	0,845-0,937
UI de F XIII/mg Fibr.-Clauss	0,440	0,096-0,131
UI de VWF:Ag/mg de Fibr.-Clauss	0,100	0,004-0,005
µg de Fibronectina/mg de Fibr.-Clauss	10,83	0,149-0,217
ng de Fibrinopéptido A/mg de Fibr.-Clauss	6,02	0,400-1,629

Tabla 5



**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para la purificación de fibrinógeno a partir de una fuente que contiene fibrinógeno empleando cromatografía en resinas de intercambio aniónico, en el que la resina de intercambio aniónico es un polímero de metacrilato hidroxilado en el que se han insertado grupos trimetilamino a través de un grupo de enlace.
2. El proceso de la reivindicación 1, en el que la fuente que contiene fibrinógeno se crioprecipita, preferiblemente se solubiliza a pH aproximadamente neutro.
3. El proceso de la reivindicación 2, en el que la solución se trata con  $Al(OH)_3$  y se elimina el gel resultante.
4. El proceso de la reivindicación 2 o 3, en el que se lleva a cabo una inactivación vírica empleando un tratamiento solvente/detergente (S/D).
5. El proceso de la reivindicación 4, en el que se realiza una extracción de reactivos S/D con aceite vegetal y se pone en contacto la fase acuosa con una resina TMAE a un valor de pH de 6,9 a 7,1 y una osmolalidad de 570 a 6120 mOsmol/l.
6. El proceso de la reivindicación 4 o 5, en el que el fibrinógeno se precipita mediante glicina, en particular, glicina a aproximadamente 1 M, y con separación de la pasta de fibrinógeno formada.
7. El proceso de la reivindicación 6, en el que la pasta de fibrinógeno se resuspende, preferiblemente en tampón TRIS a aproximadamente 20 mM a un pH de aproximadamente 8,0.
8. El proceso de la reivindicación 7, en el que tras la filtración la fracción obtenida se carga sobre una resina de intercambio aniónico fuerte que comprende grupos trimetilamino insertados en un esqueleto de polímero de metacrilato hidroxilado a través de grupos de enlace y las sustancias débilmente unidas se eliminan mediante lavado, preferiblemente con un tampón de lavado con una conductividad de aproximadamente 12,0 mS/cm.
9. El proceso de la reivindicación 8, en el que el fibrinógeno se eluye con un tampón de elución que contiene citrato sódico, cloruro sódico y glicina, preferiblemente aproximadamente a 1,5 g/l de citrato sódico, aproximadamente 7,0 g/l de cloruro sódico y aproximadamente 10,0 g/l de glicina, ajustado en particular a un pH de aproximadamente 7,0 y una conductividad de 13,1 a 15 mS/cm.
10. El proceso de la reivindicación 9, en el que la fracción obtenida se concentra, formula, esteriliza mediante filtración y/o distribuye en recipientes.
11. El proceso de la reivindicación 10, en el que la fracción obtenida se liofiliza.
12. El proceso de la reivindicación 1 que comprende las etapas de
  - a) solubilización del crioprecipitado, solubilizado a pH aproximadamente neutro,
  - b) someter a la solución a adsorción con  $Al(OH)_3$  y eliminar el gel resultante,
  - c) inactivar los virus en la solución resultante de la etapa b) mediante un tratamiento solvente/detergente (S/D), extracción de los reactivos S/D con aceite vegetal y poner en contacto la fase acuosa con una resina TMAE a un valor de pH de 6,9 a 7,1 y una osmolalidad de 570 a 610 mOsmol/l,
  - d) precipitación de fibrinógeno, que se encuentra en el flujo de paso o en el sobrenadante de la etapa c), mediante aproximadamente glicina 1 M, y separación de la pasta de fibrinógeno,
  - e) resuspensión de la pasta de fibrinógeno en un tampón TRIS 20 mM a un pH de aproximadamente 8,0, filtración y,
  - f) cargar la solución filtrada de la etapa e) en una resina de intercambio aniónico fuerte que contiene grupos trimetilamino insertados en un esqueleto de polímero de metacrilato hidroxilado a través de grupos de enlace y eliminar mediante lavado las sustancias débilmente unidas con un tampón de lavado con una conductividad de aproximadamente 12,0 mS/cm,
  - g) elución del fibrinógeno con un tampón de elución que contiene aproximadamente 1,5 g/l de citrato sódico, aproximadamente 7,0 g/l de cloruro sódico y aproximadamente 10,0 g/l de glicina, ajustado en particular a un pH de aproximadamente 7,0 y una conductividad de 13,1 a 15 mS/cm,
  - h) concentrar, formular, esterilizar mediante filtración y distribuir en recipientes.

13. Un producto de fibrinógeno que se obtiene mediante el proceso de la reivindicación 12, que tiene las siguientes propiedades:

Fibrinógeno según Clauss (turbidimétrico) [mg/ml]	20-26,0
mg de antígeno de Fibrinógeno/mg Fibr.-Clauss	0,8-1,2
UI de F XIII/mg Fibr.-Clauss	0,09-0,14
µg de Fibronectina/mg de Fibr.-Clauss	0,1-1,0
ng de Fibrinopéptido A/mg de Fibr.-Clauss	0,3-5,0

5 14. El fibrinógeno de la reivindicación 13, que se caracteriza porque está en estado liofilizado.