

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 059**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2008 PCT/EP2008/002238**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2008 WO08113589**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2008 E 08716651 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2129686**

54 Título: **Métodos para la producción a escala industrial de preparados terapéuticos del Factor H del complemento a partir de plasma humano**

30 Prioridad:

20.03.2007 EP 07005655

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

27.12.2016

73 Titular/es:

**CSL BEHRING GMBH (100.0%)
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

**LIEBING, UWE y
KARGES, HERMANN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 595 059 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

Métodos para la producción a escala industrial de preparados terapéuticos del Factor H del complemento a partir de plasma humano

Descripción

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procesos de producción industrial a gran escala de preparados del Factor H del complemento derivados de plasma humano para uso terapéutico.

Antecedentes de la invención

10 Entre los expertos se considera que el Factor H del complemento desempeña una función central en ciertas enfermedades poco habituales pero graves asociadas con la activación del complemento mediante la vía alternativa ["Membranoproliferative Glomerulonephritis type II (Dense Deposit Disease): An Update", *J Am Soc Nephrol* 16: 1392-1404, 2005; "Complement and diseases: Defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases"; P.F. Zipfel *et al.* / *Molecular Immunology* 43 (2006) 97-106]. En la bibliografía se han descrito ejemplos de
15 pacientes afectados que han sido tratados con éxito con plasma fresco congelado para sustituir Factor H del complemento ausente o disfuncional [Licht *et al.* *American Journal of Kidney diseases*, Vol. 45, N.º 2 (febrero), 2005: pág. 415-421 / "Successful plasma therapy in hemolytic uremic syndrome with complement Factor H deficiency", S. Nathanson, V. Fremeaux-Bacchi, G. Deschenes, *Pediatric Nephrology* Vol. 16 N.º 7, (2001) pág. 554-556 / *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002, 17: 684]. A pesar de ello, este tratamiento con plasma fresco congelado se relaciona con
20 ciertas desventajas, p. ej., el gran volumen necesario para infundir la cantidad deseada de Factor H del complemento, el riesgo de reacciones alérgicas asociado con la gran cantidad de proteínas inherentes infundidas y el riesgo de transmitir patógenos de transmisión sanguínea.

A día de hoy, no existe ninguna composición farmacéutica que comprenda un concentrado del Factor H del complemento que permita la sustitución del Factor H del complemento de un modo más conveniente, mejor tolerado
25 (menos volumen, menos impurezas) y más seguro (menor riesgo de transmitir patógenos de transmisión sanguínea). Además, un concentrado del Factor H del complemento permitiría disponer de una dosis más elevada, lo cual podría suponer ventajas en ciertos casos. Por consiguiente, es claramente evidente que existe una demanda por un concentrado del Factor H del complemento de este tipo para uso terapéutico.

Una fuente adecuada para la fabricación de un concentrado del Factor H del complemento es el plasma sanguíneo humano, en el que el Factor H del complemento se encuentra con una concentración de aprox. 500 (200-600) mg/L.
30 El plasma sanguíneo humano se ha utilizado industrialmente durante décadas para la fabricación de productos proteicos del plasma ampliamente establecidos y aceptados tales como, p. ej., albúmina humana, preparados de inmunoglobulina (IgG), concentrados de factores de coagulación (Factor de coagulación VIII, Factor de coagulación IX, complejo de protrombina, etc.) e inhibidores (Antitrombina, inhibidor C1, etc.). Durante el desarrollo de tales fármacos derivados del plasma, se han establecido métodos de fraccionamiento del plasma, que han proporcionado
35 productos intermedios enriquecidos en ciertas fracciones proteicas, los cuales sirven entonces como material de partida para el producto proteico del plasma correspondiente. Se revisan los procesos habituales en, p. ej., Schultze HE, Heremans JF; *Molecular Biology of Human Proteins. Volume I: Nature and Metabolism of Extracellular Proteins* 1966, Elsevier Publishing Company; págs. 236-317, y en las figuras 1 y 2 se proporcionan representaciones esquemáticas simplificadas de tales procesos. Estos tipos de tecnologías de separación permiten la fabricación de
40 varios productos proteicos del plasma terapéuticos procedentes de la misma fuente donante de plasma, lo cual proporciona ventajas desde el punto de vista económico en comparación con la producción de un único producto proteico del plasma procedente de una única fuente donante y, por consiguiente, se han adoptado como el estándar industrial en el fraccionamiento de plasma sanguíneo.

Los procesos industriales modernos de fraccionamiento del plasma están controlados por autoridades reguladoras
45 (p. ej., FDA (siglas en inglés referentes a la Agencia de Alimentos y Medicamentos), EMEA (siglas en inglés referentes a la Agencia Europea de Medicamentos)) y deben cumplirse regulaciones estrictas (cGMP, siglas en inglés referentes a las buenas prácticas de fabricación actuales) en cuanto a la solidez de los procesos y la calidad constante de los productos farmacéuticos resultantes. Resulta complejo realizar cambios en los procesos de fabricación autorizados en cuanto al tiempo y el esfuerzo que supone su validación y, además, se corre el riesgo de
50 que estos cambios afecten de forma negativa a la calidad del producto farmacéutico. Por lo tanto, en el desarrollo de procesos de fabricación a escala industrial para nuevas proteínas terapéuticas procedentes de plasma humano, como es el caso del Factor H del complemento, resulta deseable mantener la integridad de procesos ya existentes/autorizados.

La presente invención proporciona métodos de extracción del Factor H del complemento a partir de fracciones
55 secundarias de procesos de fraccionamiento del plasma existentes/autorizados a escala industrial/gran escala y el

procesamiento adicional para obtener preparados farmacéuticos a escala industrial/gran escala.

La expresión “escala industrial/gran escala”, respecto a la presente invención, se refiere a un procedimiento de producción basado en al menos 200 L de plasma, preferentemente al menos 500 L, aún más preferentemente al menos 2000 L de plasma humano. Respecto a la producción, los procesos reivindicados que parten de plasma humano deben basarse en el subfraccionamiento de intermedios industriales habituales obtenidos mediante los procesos de fraccionamiento del plasma mencionados anteriormente. El sobrenadante del precipitado en etanol al 8% (método de Cohn *et al.*; Schultze *et al.* (remítase más arriba), pág. 251), el precipitado II+III (método de Oncley *et al.*; Schultze *et al.* (remítase más arriba) pág. 253) o el precipitado B (método de Kistler y Nitschmann; Schultze *et al.* (remítase más arriba), pág. 253) son ejemplos de una fuente de Factor H del complemento compatible con el fraccionamiento del plasma a escala industrial de un modo tal que el Factor H del complemento se encuentra enriquecido en fracciones secundarias que no afectan a procesos de fabricación ya establecidos y autorizados de productos del plasma que están siendo inspeccionados por las autoridades reguladoras farmacéuticas.

Durante la fabricación de antitrombina III (AT) a partir del sobrenadante de etanol al 8% mediante cromatografía de afinidad de heparina, el Factor H del complemento, en ciertas condiciones, se une a la Heparina inmovilizada y se puede purificar a partir de fracciones (residuales) que no contengan AT. En los casos en los que no se absorbe AT procedente del sobrenadante al 8% o en los que el Factor H del complemento no se une a la resina de afinidad de Heparina en las condiciones dadas, el Factor H del complemento se encuentra enriquecido en los precipitados secundarios de los procesos de fabricación de inmunoglobulina establecidos y se considera como una impureza.

Un aspecto adicional en la fabricación de preparados proteicos del plasma terapéuticos es el riesgo potencial de transmitir patógenos de transmisión sanguínea, p. ej., el virus de la hepatitis B y C (VHB y VHC), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus linfotrópico humano de células T (VLHT-I), parvovirus B19, virus de la hepatitis A (VHA), citomegalovirus (CMV) [revisados en: “Virus safety of human blood, plasma, and derived products”; *Thrombosis Research*, Volumen 107, Suplemento 1, 31 de octubre de 2002, páginas S39-S45 Lutz G. Guertler] y, aunque con un riesgo menor, agentes causantes de encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET).

La presente invención proporciona preparados farmacéuticos del Factor H del complemento producidos mediante los métodos de la invención. Los preparados producidos de este modo tienen concentraciones del Factor H del complemento de 5 mg/mL o superiores, preferentemente 50 mg/mL o superiores, más preferentemente 100 mg/mL o superiores.

Antecedentes

El Factor H del complemento fue descrito por primera vez por Nilsson y Mueller-Eberhard (*J Exp Med*, 122, pág. 277-298) y en la bibliografía se describen varios métodos para su purificación (p. ej., Alsenz *et al.*, *Biochem J* (1984), 224, 389-398 / Fearon, *J. Immunol.* (1977) 119, 1248-1252 / Crossley *et al.*, *Biochem J* (1980), 191. 173-182). A pesar de ello, estos métodos son tecnologías típicas de pequeña escala para obtener una única proteína de pureza elevada con el propósito de caracterizarla y no son adecuados para la fabricación rutinaria de fármacos proteicos del plasma. Los procedimientos de purificación citados en EP0222611 también son metodologías de laboratorio típicas desarrolladas exclusivamente para la purificación únicamente del Factor H del complemento a partir de suero o plasma humano.

La solicitud de patente PCT/EP2006/005631 describe un proceso para la purificación de Factor H del complemento funcional basado en intermedios obtenidos mediante la precipitación fraccionada a gran escala de plasma o suero humano con etanol, que no afecta a la aprobación reguladora de otras proteínas terapéuticas que se obtienen comercialmente a partir de plasma, así como también un proceso para la purificación de Factor H del complemento funcional en el cual la purificación se basa en el sobrenadante del precipitado en etanol al 8% de acuerdo con el método de Cohn o el precipitado III de acuerdo con el método de Oncley o el precipitado B de acuerdo con el método de Kistler y Nitschmann. El documento PCT/EP2006/005631 también describe un proceso para la purificación de Factor H del complemento funcional, basado en intermedios obtenidos mediante la precipitación fraccionada a gran escala de suero o plasma humano con etanol en combinación con procedimientos cromatográficos, donde estos procedimientos cromatográficos se pueden basar en la precipitación con polietilenglicol (Nagasawa S, Stroud RM; *Mol Immunol* 1980; 17: 1365-72), cromatografía de afinidad mediante heparina inmovilizada (citación según se ha indicado más arriba), cromatografía de intercambio iónico (Crossley LG, Porter RR; *Biochem J* 1980; 191 : 173-82) y cromatografía de interacción hidrófoba (Ripoche J, Al Salih A, Rousseaux J, Fontaine M ; *Biochem J* 1984; 221, 89-96). Finalmente, el documento PCT/EP2006/005631 describe un proceso para la purificación de Factor H del complemento funcional a partir de un eluato separando el Factor H del complemento de la antitrombina III.

Moure *et al.* (2003) *Meat Science* Vol. 64, N.º 4, páginas 391 – 398 describe un proceso de acoplamiento para el fraccionamiento proteico del plasma que utiliza precipitación en etanol y cromatografía de intercambio iónico.

Bumouf (1995) *Journal of Chromatography B* 664, páginas 3 – 15 es un artículo de revisión sobre los beneficios y las

tendencias futuras de la cromatografía en el fraccionamiento del plasma.

Burnouf y Radosevich (2003) *Haemophilia* 9, páginas 24 – 37 es un artículo de revisión sobre la nanofiltración de productos biofarmacéuticos derivados de plasma.

5 Bakaltcheva *et al.* (2007) *Thrombosis Research* 120, páginas 105 - 116 evalúa la sacarosa, la trehalosa, el sorbitol, el manitol y la glicina como estabilizantes para plasma entero liofilizado.

Pikal *et al.* (1991) *Pharmaceutical Research* Vol. 8, N.º 4, páginas 427 - 436 investiga los efectos de variables de formulación sobre la estabilidad de una hormona de crecimiento humana liofilizada.

El documento EP 0 317 376 A1 se refiere a un proceso para la preparación de un concentrado de Factor IX de pureza elevada.

10 El documento EP 1 739 093 A1 describe procesos para la separación de proteínas del plasma, en particular de fibrinógeno y Factor XIII.

Compendio de la invención

15 La presente invención proporciona procesos de producción industrial a gran escala para preparados del Factor H del complemento derivados de plasma humano para uso terapéutico, que utilizan fracciones secundarias de procesos de fraccionamiento ya establecidos y autorizados que no afectan a la integridad de dichos procesos autorizados, combinados con métodos para la desactivación y/o eliminación de virus/patógenos.

Descripción detallada de la invención

Por consiguiente, la invención se refiere a un método para la purificación de Factor H del complemento en una solución que comprende los pasos de:

- 20 a) proporcionar una fracción que comprende Factor H del complemento mediante la precipitación fraccionada a gran escala de suero o plasma humano con etanol, donde mediante dicho proceso de precipitación fraccionada a gran escala se produce al menos una proteína farmacéutica adicional que se puede obtener comercialmente
- 25 b) purificar adicionalmente el Factor H del complemento mediante al menos un método de purificación seleccionado del grupo siguiente:
- I. Cromatografía de afinidad de heparina
 - II. Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés)
 - III. Cromatografía de intercambio aniónico (AEC, por sus siglas en inglés)
 - 30 IV. Cromatografía de intercambio catiónico (CEC, por sus siglas en inglés)
 - V. Cromatografía de hidroxapatita (HAC, por sus siglas en inglés)
 - VI. Cromatografía de inmunoafinidad
- c) tratar la fracción que contiene el Factor H del complemento al menos una vez antes, durante o después del paso b) de dicho proceso de purificación con un método de desactivación y/o eliminación de virus/patógenos;

35 donde la purificación del Factor H del complemento comprende los siguientes pasos del proceso:

- I. una cromatografía de intercambio aniónico inicial
- II. seguida de una cromatografía de interacción hidrófoba
- III. seguida de pasteurización
- IV. seguida de una cromatografía de afinidad de heparina
- 40 V. seguida de nanofiltración.

La proteína farmacéutica adicional podría ser, a modo de ejemplo no limitante, una o más de las proteínas seleccionadas entre albúmina, antitrombina III, Factor VIII, Factor IX, fibrinógeno, Factor XIII, trombina (FIIa), FVII/IIa, preparados de complejos de protrombina (PPSB), inhibidor de la proteinasa alfa-1, inhibidor C1, inmunoglobulinas, transferrina, butirilcolinesterasa.

45 La tecnología de desactivación o eliminación de virus/patógenos se puede seleccionar, a modo de ejemplo no limitante, entre pasteurización, tratamiento con disolvente/detergente o nanofiltración.

La pasteurización, en el sentido de la invención, se refiere a métodos que exponen una composición líquida del Factor H a una temperatura de 60 ± 1 °C durante un tiempo de al menos 10 h

El tratamiento con disolvente/detergente, en el sentido de la invención, se refiere a métodos de tratamiento de una

composición líquida del Factor H con formulaciones de fosfato de tri-*n*-butilo y un detergente seleccionado del grupo constituido por Tritón X-100, Tween o colato sódico.

5 La nanofiltración, en el sentido de la invención, se refiere a métodos para eliminar virus y/o agentes causantes de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) de una composición líquida del Factor H, comprendiendo dicho método filtrar dicha solución del Factor H a través de un filtro que tenga un tamaño de poro ≤ 80 nm.

Las diferentes tecnologías de purificación se pueden repetir una o varias veces o se pueden combinar unas con otras dependiendo del nivel deseado de pureza para el Factor H del complemento de grado farmacéutico final.

La cromatografía, en el sentido de la invención, se refiere a una cualquiera de las siguientes técnicas:

10 • aplicar el Factor H del complemento en solución a una matriz de unión respectiva, unir el Factor H del complemento a dicha matriz, opcionalmente lavar dicha matriz una o más veces, en unas condiciones en las que el Factor H del complemento permanezca unido a la matriz, aplicar a continuación una solución a la matriz con el Factor H del complemento unido que provoque la elución del Factor H del complemento a partir de la matriz de unión, o

15 • aplicar el Factor H del complemento en solución a una matriz de unión respectiva, unir las impurezas a dicha matriz a la vez que se deja el Factor H en la fracción no unida.

Opcionalmente, dichos procesos también comprenderán un paso de precipitación/eliminación de lípidos, o la adición de un inhibidor de proteasas o la eliminación de una proteasa.

La invención engloba preparados del Factor H del complemento obtenidos mediante cualquiera de los procesos mencionados anteriormente.

20 Un preparado farmacéutico, en el sentido de la invención, es cualquier composición que comprenda Factor H del complemento que se pueda utilizar en medicina.

25 Una realización preferida de los métodos expuestos anteriormente para la purificación del Factor H consiste en empezar la purificación a partir de una fracción que comprenda Factor H del complemento obtenida mediante la precipitación fraccionada a gran escala de suero o plasma humano con etanol la cual es una fracción residual, p. ej., una fracción a partir de la cual no se obtiene ningún producto farmacéutico en la actualidad.

Figuras:

Figura 1: representación esquemática de un fraccionamiento de plasma industrial de Cohn/Oncley modificado

Figura 2: representación esquemática de un fraccionamiento de plasma industrial de Kistler/Nitschmann modificado

Ejemplos:

30 Las concentraciones del Factor H del complemento a las que se hace referencia en las siguientes secciones se obtienen mediante un ensayo de inmunodifusión radial (RID, por sus siglas en inglés) disponible en el mercado ("HUMAN FACTOR H 'NL' BINDARID™"; código del producto: RN030.3; The Binding Site Limited, Birmingham, Reino Unido).

1. Obtención de una fracción que comprende Factor H del complemento

35 a. Sobrenadante en etanol al 8% (Fracción I) en el fraccionamiento de Cohn(Oncley)

40 Cuando se aplican los métodos de fraccionamiento de Cohn/Oncley, el Factor H del complemento se encuentra comprendido en el sobrenadante de la precipitación en etanol al 8%. En el caso de separar antitrombina III (AT) a partir del sobrenadante en etanol al 8% mediante cromatografía de afinidad de Heparina, el Factor H del complemento, en ciertas condiciones, se une a la Heparina inmovilizada y se puede purificar a partir de las fracciones (residuales) que no contienen AT (remítase más abajo).

b. Fracción III en el fraccionamiento de Cohn(Oncley)

Si el Factor H del complemento no se recupera partir del sobrenadante en etanol al 8%, se encuentra enriquecido en la Fracción III, una fracción secundaria de los procedimientos típicos de producción de inmunoglobulina.

c. Precipitado B en el fraccionamiento de Kistler/Nitschmann

45 Cuando se utilizan los métodos de fraccionamiento de Kistler/Nitschmann, el Factor H del complemento se encuentra enriquecido en el Precipitado B, una fracción secundaria de los procedimientos típicos de producción de

inmunoglobulina.

2. Métodos de purificación adicionales

a. Cromatografía de afinidad de heparina

5 Ya que el Factor H del complemento tiene una afinidad conocida por los glicosaminoglicanos, la cromatografía de afinidad de heparina es un método de purificación adecuado. Se puede utilizar heparina o derivados de heparina o productos que mimeticen la heparina, inmovilizados en matrices de base polimérica o basadas en agarosa. Algunos ligandos de afinidad similares a la heparina alternativos de función comparable son, p. ej., el sulfato de condroitina, sulfato de heparán, sulfato de dermatán, sulfato de queratán, u oligómeros sintéticos, p. ej., éster del sulfato de celobiosa (sulfato de cellulose Matrex™), o análogos terapéuticos de la heparina, p. ej., oligosacáridos sulfatados que representan estructuras parciales de la heparina (p. ej., pentasacáridos sulfatados, tetrasacáridos sulfatados).

10 La fracción que actúa como fuente (lavado rico en Factor H del complemento procedente de la cromatografía de afinidad de heparina del sobrenadante al 8% procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o la Fracción III redisuelta procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o el Precipitado B redisuuelto procedente de un fraccionamiento de Kistler/Nitschmann o dicha fracción en la cual se han eliminado los lípidos, p. ej., mediante el método descrito en el apartado 2.g.) se formula para obtener una conductividad correspondiente < 25 mS/cm (25 °C) y un pH de 5 - 9 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato). La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna con una resina de afinidad de heparina (heparina inmovilizada en Toyopearl HW-65). La columna se lava con una solución tampón de bajo contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente ascendente de NaCl (0 - 1 mol/L) en el mismo tampón.

15 El sobrenadante al 8% de un fraccionamiento de Cohn/Oncley modificado (remítase a la Figura 1) se sometió a una cromatografía de afinidad de heparina. Se añadieron aprox. 0.08 L de resina de afinidad de heparina (heparina inmovilizada en Toyopearl HW-65) por litro de sobrenadante al 8% y la suspensión se agitó durante aprox. 1 h en condiciones de refrigeración. Posteriormente, la resina se recuperó por filtración y se transfirió a una columna de cromatografía. El Factor H del complemento se eluyó de la resina utilizando una solución que contenía aprox. 0.25 mol/L de citrato trisódico dihidratado a un pH de 6.25, mientras que la ATIII permaneció unida a la columna.

Tabla 1: Factor H del complemento purificado mediante cromatografía de afinidad de heparina basándose en un sobrenadante en etanol al 8% (Fracción I) del fraccionamiento de Cohn(Oncley)

Muestra	Volumen [L]	Absorción a 280 nm	Factor H [mg/L]	Factor H [%]
Sobrenadante al 8%	2955	n.a.	308	100
Eluato de citrato	500	8.6	1530	84

30 Este proceso para purificar el Factor H del complemento no afecta a los procesos de fabricación autorizados del producto ATIII ni de los productos preparados a partir del fraccionamiento del sobrenadante de afinidad de heparina (p. ej., IgG, albúmina, α -1 PI, etc.).

b. Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

35 El Factor H del complemento, en ciertas condiciones, se une a resinas de HIC adecuadas y se puede desorber con sistemas tampón de fuerza iónica baja. Algunos ligandos de HI adecuados son, p. ej., fenilo, octilo, butilo, metilo, así como también ligandos módem multimodales (p. ej. hexilamina, fenilpropilamina, 4-mercaptoetilpiridina) inmovilizados en matrices de base polimérica o basadas en agarosa. Algunos ejemplos de medios multimodales o medios de HIC disponibles en el mercado son, p. ej., Fenil Sepharose, Octil Sepharose, Butil Sepharose, Capto™ MMC (todos ellos de GE Healthcare), Toyopearl Fenil-650, Toyopearl Butil-650, Toyopearl Hexil-650 (todos ellos de Tosoh Biosciences), soporte para HIC Macro-Prep Metil, soporte para HIC Macro-Prep t-Butil (Bio-Rad), HEA HyperCel; PPA HyperCel, MEP HyperCel (todos ellos de Pall). En una realización preferida, se utiliza butilo como ligando, lo cual da como resultado la mejor recuperación del Factor H del complemento.

45 La fracción que actúa como fuente (lavado rico en Factor H del complemento procedente de la cromatografía de afinidad de heparina del sobrenadante al 8% procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o la Fracción III redisuelta procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o el Precipitado B redisuuelto procedente de un fraccionamiento de Kistler/Nitschmann o dicha fracción en la cual se han eliminado los lípidos, p. ej., mediante el método descrito en el apartado 2.g.) se formula para obtener una conductividad correspondiente > 100 mS/cm (25 °C) y un pH de 5 - 9 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato). La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna empaquetada con Butil Sepharose FF (GE Healthcare). La columna se lava con una solución tampón de alto contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico, 2 mol/L de NaCl) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente

descendente de NaCl (2 - 0 mol/L) en el mismo tampón.

El lavado rico en Factor H del complemento procedente de la cromatografía de afinidad de heparina del sobrenadante al 8% se sometió a un proceso de eliminación de lípidos (remítase más abajo) y se ajustó hasta obtener una conductividad de aprox. 130 mS/cm mediante la adición de NaCl y un valor de pH de 5.5. La solución se aplicó a una columna empaquetada con Butil Sepharose FF (GE Healthcare) y el Factor H del complemento se unió a la resina en dichas condiciones. Después de lavar la columna con una solución tampón de alto contenido en sales (2 mol/L de NaCl, 200 mmol/L de citrato trisódico dihidratado, pH de 5.5), el Factor H del complemento se eluyó mediante un gradiente por pasos hasta llegar a un 30% de la concentración de NaCl inicial en el mismo tampón.

Tabla 2: Factor H del complemento purificado mediante cromatografía de interacción hidrófoba basándose en un sobrenadante en etanol al 8% (Fracción I) del fraccionamiento de Cohn(Oncley)

Muestra	Absorción a 280 nm	Factor H [mg/L]	Factor H [%]
Filtrado de PEG	4.1	915	100
Eluato de Butil Sepharose	1.5	1503	75

c. Cromatografía de intercambio aniónico (AEC)

El Factor H del complemento, en ciertas condiciones, se une a resinas de AEC adecuadas y se puede desorber con sistemas tampón de fuerza iónica elevada. Algunos ligandos de AEC adecuados son, p. ej., dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) o amonio cuaternario (Q) inmovilizado en matrices de base polimérica o basadas en agarosa. Algunos medios de intercambio aniónico disponibles en el mercado son, p. ej., DEAE-Sepharose, Q-Sepharose (GE Healthcare), Toyopearl DEAE-650, Toyopearl Super Q-650 (Tosoh Biosciences), Fractogel EMD DEAE, Fractogel EMD TMAE (Merck KGaA), soporte Macro-Prep DEAE, soporte Macro-Prep High Q (BioRad), DEAE HyperD, Q HyperD, DEAE Trisacryl, DEAE Spherodex (todos ellos de Pall). En una realización preferida, se utiliza amonio cuaternario inmovilizado en una matriz base constituida al menos parcialmente por dextrano (Q-Sepharose XL, Capto™ Q) debido a una capacidad de unión del Factor H del complemento significativamente superior en comparación con otros medios de AEC.

Los medios de AEC que presentan una capacidad de unión baja o más baja para el Factor H se pueden utilizar en modo negativo, lo cual significa que, en ciertas condiciones, únicamente las impurezas se unen a la matriz, mientras que el Factor H permanece en la fracción no unida. Algunos ejemplos de medios de AEC con una capacidad de unión baja o más baja para el Factor H son, p. ej., DEAE Sepharose FF, Toyopearl DEAE-650, soporte MacroPrep DEAE.

La fracción que actúa como fuente (lavado rico en Factor H del complemento procedente de la cromatografía de afinidad de heparina del sobrenadante al 8% procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o la Fracción III redisuelta procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o el Precipitado B redisuelto procedente de un fraccionamiento de Kistler/Nitschmann o dicha fracción en la cual se han eliminado los lípidos, p. ej., mediante el método descrito en el apartado 2.g.) se formula para obtener una conductividad correspondiente < 6 mS/cm (25 °C) y un pH de 7 - 9 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato). La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna empaquetada con Q-Sepharose XL (GE Healthcare). La columna se lava con una solución tampón de bajo contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico, 2 mol/L de NaCl) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente ascendente de NaCl (0 - 1 mol/L) en el mismo tampón.

La fracción secundaria rica en Factor H del complemento procedente del paso de afinidad de heparina de acuerdo con el ejemplo 1 o, como alternativa, el material sometido al proceso de eliminación de lípidos de acuerdo con 2 g se ajustó hasta obtener un valor de pH de 9 y se diluyó hasta obtener una conductividad < 6 mS/cm. La solución diluida se aplicó a una columna empaquetada con Capto™ Q (GE Healthcare) y el Factor H del complemento se unió a la resina en dichas condiciones. Después de lavar la columna con una solución tampón de bajo contenido en sales (25 mmol/L de TRIS, pH de 7.5), el Factor H del complemento se eluyó mediante un gradiente ascendente de NaCl (0 - 0.5 mol/L) en el mismo tampón.

Tabla 3: Factor H del complemento purificado mediante cromatografía de intercambio aniónico basándose en un sobrenadante en etanol al 8% (Fracción I) del fraccionamiento de Cohn(Oncley)

Muestra	Absorción a 280 nm	Factor H [mg/L]	Factor H [%]
Filtrado de PEG	3.6	735	100
Eluato de Capto Q	2.9	2355	76

La fracción que actúa como fuente (lavado rico en Factor H del complemento procedente de la cromatografía de afinidad de heparina del sobrenadante al 8% procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o la Fracción III redisuelta procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o el Precipitado B redisuuelto procedente de un fraccionamiento de Kistler/Nitschmann o dicha fracción en la cual se han eliminado los lípidos, p. ej., mediante el método descrito en el apartado 2.g.) se formula para obtener una conductividad correspondiente < 20 mS/cm (25 °C) y un pH de 5 - 9 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato). La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna empaquetada con DEAE-Sepharose FF (GE Healthcare). En estas condiciones, el Factor H se encuentra comprendido en la fracción no unida. Opcionalmente, la columna se puede lavar posteriormente con una solución tampón de bajo contenido en sales para recuperar cantidades traza del Factor H que hayan quedado en la fase líquida del empaquetamiento de la columna.

d. Cromatografía de intercambio catiónico (CEC)

El Factor H del complemento, en ciertas condiciones, se une a resinas de CEC adecuadas y se puede desorber con sistemas tampón de fuerza iónica elevada. Algunos ligandos de CEC adecuados son, p. ej., carboximetilo (CM), sulfopropilo (SP) o metilsulfonato (S) o similares, inmovilizados en matrices de base polimérica o basadas en agarosa. Algunos medios de intercambio catiónico disponibles en el mercado son, p. ej., CM-Sepharose, SP-Sepharose (GE Healthcare), Toyopearl CM-650, Toyopearl SP-650 (Tosoh Biosciences), Fractogel EMD SO₃⁻, Fractogel EMD COO⁻ (Merck KGaA), soporte Macro-Prep CM, soporte Macro-Prep High S (BioRad), CM HyperD, S HyperD, CM Trisacryl, SP Trisacryl, SP Spherodex (todos ellos de Pall).

La fracción que actúa como fuente (lavado rico en Factor H del complemento procedente de la cromatografía de afinidad de heparina del sobrenadante al 8% procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o la Fracción III redisuelta procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o el Precipitado B redisuuelto procedente de un fraccionamiento de Kistler/Nitschmann o dicha fracción en la cual se han eliminado los lípidos, p. ej., mediante el método descrito en el apartado 2.g.) se formula para obtener una conductividad correspondiente < 20 mS/cm (25 °C) y un pH de 5 - 7 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato). La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna empaquetada con Fractogel EMD SO₃⁻ (Merck). La columna se lava con una solución tampón de bajo contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente ascendente de NaCl (0 - 1 mol/L) en el mismo tampón.

La fracción secundaria rica en Factor H del complemento procedente del paso de afinidad de heparina de acuerdo con el ejemplo 1 o, como alternativa, el material sometido al proceso de eliminación de lípidos de acuerdo con la sección 2 g se ajustó hasta obtener un valor de pH de 6 y se diluyó hasta obtener una conductividad < 6 mS/cm. La solución diluida se aplicó a una columna empaquetada con SP Sepharose FF (GE Healthcare) y el Factor H del complemento se unió a la resina en dichas condiciones. Después de lavar la columna con una solución tampón de bajo contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico dihidratado, pH de 6.5), el Factor H del complemento se eluyó mediante un gradiente ascendente de NaCl (0 - 0.5 mol/L) en el mismo tampón.

Tabla 4: Factor H del complemento purificado mediante cromatografía de intercambio catiónico basándose en un sobrenadante en etanol al 8% (Fracción I) del fraccionamiento de Cohn(Oncley)

Muestra	Absorción a 280 nm	Factor H [mg/L]	Factor H [%]
Filtrado de PEG	3.9	840	100
Eluato de SP Sepharose	5.6	3500	95

e. Cromatografía de hidroxapatita (HAC)

El Factor H del complemento se puede purificar utilizando compuestos constituidos por preparados de fosfato cálcico, fluoroapatita, hidroxapatita o similares a hidroxapatita como fase sólida para cromatografía. Tales medios pueden ser, p. ej., Bio-Gel de hidroxapatita HT y HTP (Bio-Rad), Fluoroapatita cerámica, Hidroxapatita cerámica (Bio-Rad), HA Ultrogel (Pall) y similares.

El Factor H del complemento, en ciertas condiciones, se une a la matriz de HA y se puede desorber utilizando sistemas tampón que contienen concentraciones de sal, preferentemente fosfato, cada vez mayores.

La fracción que actúa como fuente (lavado rico en Factor H del complemento procedente de la cromatografía de afinidad de heparina del sobrenadante al 8% procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o la Fracción III redisuelta procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o el Precipitado B redisuuelto procedente de un

fraccionamiento de Kistler/Nitschmann o dicha fracción en la cual se han eliminado los lípidos, p. ej., mediante el método descrito en el apartado 2.g.) se formula para obtener una conductividad correspondiente < 15 mS/cm (25 °C) y un pH de 5 - 9 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato). La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna empaquetada con HA Ultrogel (Pall). La columna se lava con una solución tampón de bajo contenido en sales (p. ej., 10 mmol/L de fosfato de potasio) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente ascendente de fosfato (0 - 1 mol/L).

f. Cromatografía de inmovilización

El Factor H del complemento se puede capturar y purificar mediante cromatografía de inmovilización. Se inmovilizan anticuerpos específicos para el Factor H del complemento en matrices de cromatografía adecuadas. Las matrices adecuadas para aplicaciones a gran escala son resinas preactivadas, p. ej., Sepharose 6B activada con epoxi, EAH Sepharose 4B, Amino Sepharose 6 FF, 6-AKS Sepharose 4FF, Toyopearl AF Epoxi, Toyopearl AF Amino, Toyopearl AF Tresilo o similares. Los procedimientos de acoplamiento son conocidos por los expertos en la técnica. Las soluciones que contienen el Factor H del complemento se aplican en tales inmunoabsorbentes en condiciones en las que el Factor H del complemento se une a los anticuerpos inmovilizados. Las impurezas no unidas se eliminan lavándolas con sistemas tampón adecuados (p. ej., tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de HEPES) y posteriormente se eluye el Factor H del complemento a partir del inmunoabsorbente utilizando, p. ej., concentraciones lo suficientemente elevadas de sales caotrópicas (p. ej., tiocianato, bromuro de litio, etc.) o sistemas tampón de pH bajo (p. ej., glicina, pH de 2 - 3) o sistemas tampón de pH elevado (p. ej., tampón de TRIS, pH de 9).

La fracción que actúa como fuente (lavado rico en Factor H del complemento procedente de la cromatografía de afinidad de heparina del sobrenadante al 8% procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o la Fracción III redisuelta procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o el Precipitado B redisuelto procedente de un fraccionamiento de Kistler/Nitschmann o dicha fracción en la cual se han eliminado los lípidos, p. ej., mediante el método descrito en el apartado 2.g.) se formula en HEPES a un pH de 7.6. La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna empaquetada con un inmunoabsorbente portador de anticuerpos anti-Factor H. La columna se lava con el tampón de HEPES mencionado y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente ascendente de KCNS (0 - 1 mol/L).

3. Pasos de purificación adicionales opcionales

a. Eliminación de lípidos

Debido a que las fracciones ricas en el Factor H del complemento a las que se hace referencia en la sección "1. Obtención de una fracción que comprende Factor H del complemento" pueden contener impurezas de lipoproteínas o lípidos, podría ser necesario eliminarlas antes de las técnicas de purificación posteriores basadas en cromatografía para proteger las resinas de cromatografía de la acumulación cada vez mayor de dichos lípidos ("contaminación de la columna"). Las impurezas de lípidos se pueden eliminar de las soluciones de proteínas utilizando medios de, p. ej., precipitación o adsorción. Algunos agentes precipitantes adecuados son, p. ej., polietilenglicoles (PEG) o sulfato de amonio, algunos adsorbentes adecuados son, p. ej., sílice en polvo ("sílice pirogénica"; Aerosil 200, Aerosil 380), sulfatos de dextrano o fluorocarburos (Freon-113).

La fracción que actúa como fuente (lavado rico en Factor H del complemento procedente de la cromatografía de afinidad de heparina del sobrenadante al 8% procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o la Fracción III redisuelta procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o el Precipitado B redisuelto procedente de un fraccionamiento de Kistler/Nitschmann) se formula para obtener una conductividad correspondiente < 40 mS/cm (25 °C) y un pH de 5 - 9 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato) a una temperatura de 0 - 40 °C. A la solución que contiene Factor H del complemento acondicionada de este modo se le añade PEG 4000 para obtener como resultado una concentración final de un 2 - 10% p/v. Como alternativa, se pueden utilizar polietilenglicoles de otros pesos moleculares, donde pesos moleculares más elevados requieren concentraciones finales más bajas y viceversa. Tras un periodo de incubación suficiente para conseguir la precipitación de las impurezas objetivo, se elimina el precipitado por filtración o centrifugación.

El lavado rico en Factor H del complemento (32 mS/cm, pH de 6.2) procedente de la cromatografía de afinidad de heparina del sobrenadante al 8% se calentó hasta 30 °C. Se añadió un concentrado de PEG 4000 (25% p/v) para obtener una concentración final de PEG de un 7.5% p/v. La mezcla se agitó durante 30 min (30 °C) y se filtró a través de una combinación de filtros de profundidad tras la adición de 10 g/L del adyuvante de filtración perlita.

Tabla 5: Eliminación de lípidos en el lavado rico en Factor H del complemento procedente de la cromatografía de afinidad de heparina del sobrenadante al 8% procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley utilizando

precipitación con PEG

Muestra	Abs. a 280 nm	Factor H		Triglicérido		Colesterol	
		[mg/L]	[%]	[mg/dL]	[%]	[mg/dL]	[%]
Eluato de citrato	8.4	1596	100	75	100	162	100
Filtrado de PEG 4000	3.6	915	78.3	3	5.5	17	14.3

5 La Fracción III se resuspendió en solución tampón de citrato hasta obtener una conductividad de 30.5 mS/cm y un valor de pH de 6.3 (25 °C). Se añadió polietilenglicol 4000 hasta obtener una concentración final de un 7.5%. Posteriormente, la suspensión se filtró a través de una combinación de filtros de profundidad.

Tabla 6: Eliminación de lípidos en la resuspensión en tampón de citrato rica en Factor H del complemento de la Fracción III procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley utilizando precipitación con PEG

Muestra	Absorción a 280 nm	Factor H [mg/L]	Factor H [%]
Suspensión de la Fracción III	9.6	318	100
Filtrado	4.3	178	59

10 El Precipitado B se resuspendió en solución tampón de citrato hasta obtener una conductividad de 29.5 mS/cm y un valor de pH de 6.3 (25 °C). Se añadió polietilenglicol 4000 hasta obtener una concentración final de un 7.5%. Posteriormente, la suspensión se filtró a través de una combinación de filtros de profundidad.

Tabla 7: Eliminación de lípidos en la resuspensión en tampón de citrato rica en Factor H del complemento del Precipitado B procedente de un fraccionamiento de Kistler/Nitschmann utilizando precipitación con PEG

Muestra	Absorción a 280 nm	Factor H [mg/L]
Filtrado	4.8	268

15 b. Eliminación o inhibición de impurezas proteolíticas

Debido a que las fracciones secundarias ricas en el Factor H del complemento a las que se hace referencia en la sección "1. Obtención de una fracción que comprende Factor H del complemento" pueden contener impurezas proteolíticas, capaces de escindir la molécula del Factor H del complemento lo cual proporcionaría formas truncadas de función deficiente, podría ser necesario implementar métodos adecuados para eliminar o inhibir estas impurezas procedentes de/contenidas en las soluciones que contienen Factor H del complemento lo antes posible en el proceso de fabricación.

20 Algunas medidas adecuadas para eliminar tales impurezas proteolíticas son los métodos cromatográficos que utilizan inhibidores de proteasas inmovilizados en matrices de base polimérica o basadas en agarosa. Tales inhibidores de proteasas pueden ser, p. ej., benzamidina, 4-aminobenzamidina, clorhidrato de benzamidina y sus derivados, lisina y sus derivados, ácido 6-aminohexanoico (ácido ϵ -aminocaproico) y sus derivados, ácido *trans*-4-(aminometil)ciclohexanocarboxílico (ácido tranexámico) y sus derivados, fluoruro de 4-(2-aminoetil)benzenosulfonilo (AEBSF) y sus derivados, fluoruro de (4-amidinofenil)metanosulfonilo (APMSF) y sus derivados, 3,4-dicloroisocumarina (DCI) y sus derivados, acetyl-leucil-leucil-arginal (Leupeptina) y sus derivados, aprotinina y sus derivados, inhibidor de la tripsina de la soja y sus derivados, α 2-antiplasmina y sus derivados, antitrombina (antitrombina III) y sus derivados. Algunos medios de cromatografía disponibles en el mercado son, p. ej., ECH Lisina Sepharose 4 B, Benzamidina Sepharose 6B (GE Healthcare), p-Aminobenzamidina Agarosa 6XL (Prometic) o similares.

30 Como alternativa a su eliminación, las impurezas proteolíticas se pueden inhibir en las soluciones que contienen Factor H del complemento añadiendo uno o más inhibidores de proteasas de entre los del grupo mencionado anteriormente a la solución y, posteriormente, eliminando el complejo de enzima/inhibidor mediante los siguientes pasos de purificación. Otra estrategia para eliminar las impurezas proteolíticas consiste en el uso de tintes inmovilizados como, p. ej., Cibacron Blue F3GA o sus derivados, otros tintes de tipo triazina como Procion Red HE-3B y sus derivados, o Procion Green H-4G y sus derivados, Reactive Red 120 y sus derivados, Reactive Green 19 y sus derivados, Reactive Yellow 86 y sus derivados, Reactive Orange 14 y sus derivados y similares, inmovilizados en matrices de base polimérica o basadas en agarosa.

- La fracción que actúa como fuente (lavado rico en Factor H del complemento procedente de la cromatografía de afinidad de heparina del sobrenadante al 8% procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o la Fracción III redisuelta procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o el Precipitado B redisuelto procedente de un fraccionamiento de Kistler/Nitschmann) se formula para obtener una conductividad correspondiente < 40 mS/cm (25 °C) y un pH de 5 - 9 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato) a una temperatura de 0 - 40 °C. La solución se hace pasar a través de una columna empacada con, p. ej., ECH Lisina Sepharose 4B (GE Healthcare) y la columna se lava posteriormente con 3 volúmenes de columna de solución tampón. Como alternativa, la Lisina Sepharose se puede incubar por lotes (añadirla a la solución e incubar a la vez que se agita) y eliminar por filtración.
- Se añade benzamidina o benzamidina*HCl o 4-aminobenzamidina o 4-aminobenzamidina*2HCl a una solución que contiene Factor H del complemento hasta obtener una concentración de S 200 mmol/L. Posteriormente, la solución se somete a uno de los métodos o combinaciones de los métodos que se han descrito en las secciones 2 a-f. 3 a-f. 4 a-c. 5 a-f.

4. Combinación de métodos de purificación

- Con el fin de obtener un producto de Factor H del complemento con una pureza más elevada que la que se consigue mediante los métodos mencionados anteriormente, cualquiera de los métodos 2 a-f y 3 a-b se puede o bien aplicar por segunda vez o bien combinar con pasos adicionales de purificación cromatográfica.

a. Cromatografía de afinidad de heparina

- Una solución que contiene Factor H del complemento resultante de uno de los métodos de las secciones 2 a-f se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía de afinidad de heparina. En la sección 2 a se hace referencia a los ligandos y/o medios adecuados.

- Las soluciones que contienen Factor H del complemento se formulan para obtener una conductividad correspondiente < 25 mS/cm (25 °C) y un pH de 5 - 9 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato). La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna de afinidad de heparina (heparina inmovilizada en Toyopearl HW-65). La columna se lava con una solución tampón de bajo contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente ascendente de NaCl (0 - 1 mol/L) en el mismo tampón.

- El eluato rico en Factor H del complemento procedente de la cromatografía de intercambio catiónico en SP Sepharose FF (de acuerdo con la sección 2d) se diluyó hasta obtener una conductividad de aprox. 6 mS/cm mediante la adición de agua y se ajustó hasta un valor de pH de 5.5. La solución se aplicó a una columna con una resina de afinidad de heparina (heparina inmovilizada en Toyopearl HW-65). La columna se lavó con una solución tampón de bajo contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico) y posteriormente el Factor H del complemento se eluyó utilizando un gradiente ascendente de NaCl (0 - 1 mol/L) en el mismo tampón.

- Tabla 8:** Factor H del complemento purificado mediante cromatografía de intercambio catiónico y posteriormente mediante cromatografía de afinidad de heparina basándose en un sobrenadante en etanol al 8% (Fracción I) del fraccionamiento de Cohn(Oncley)

Muestra	Absorción a 280 nm	Factor H [mg/L]	Factor H [%]
Eluato de SP	5.6	3500	100
Eluato de afinidad de heparina	5.2	5400	83

b. Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

- Una solución que contiene Factor H del complemento resultante de uno de los métodos de las secciones 2 a-f se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía de interacción hidrófoba. En la sección 2 b se hace referencia a los ligandos y/o medios adecuados.

- Las soluciones que contienen Factor H del complemento se formulan para obtener una conductividad correspondiente > 100 mS/cm (25 °C) y un pH de 5 - 9 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato). La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna empacada con Butil Sepharose FF (GE Healthcare). La columna se lava con una solución tampón de alto contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico, 2 mol/L de NaCl) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente descendente de NaCl (2 - 0 mol/L) en el mismo tampón.

El eluato rico en Factor H del complemento procedente de la cromatografía de intercambio catiónico en Fractogel EMD SO₃⁻ (de acuerdo con la sección 2d) se ajustó hasta obtener una conductividad de aprox. 130 mS/cm mediante

la adición de NaCl y un valor de pH de 5.5. La solución se aplicó a una columna empaquetada con Butil Sepharose FF (GE Healthcare) y el Factor H del complemento se unió a la resina en dichas condiciones. Después de lavar la columna con una solución tampón de alto contenido en sales (2 mol/L de NaCl, 200 mmol/L de citrato trisódico dihidratado, pH de 5.5), el Factor H del complemento se eluyó utilizando un gradiente por pasos hasta llegar a un 30% de la concentración inicial de NaCl en el mismo tampón.

Tabla 9: Factor H del complemento purificado mediante cromatografía de intercambio catiónico y posteriormente mediante cromatografía de interacción hidrófoba basándose en un sobrenadante en etanol al 8% (Fracción I) del fraccionamiento de Cohn(Oncley)

Muestra	Absorción a 280 nm	Factor H [mg/L]	Factor H [%]
Eluato de EMDSO ₃ ⁻	4.8	3800	100
Eluato de Butil Sepharose	1.2	1700	76

10 c. Cromatografía de intercambio aniónico (AEC)

Una solución que contiene Factor H del complemento resultante de uno de los métodos de las secciones 2 a-f se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico. En la sección 2 c se hace referencia a los ligandos y/o medios adecuados.

15 Las soluciones que contienen Factor H del complemento se formulan para obtener una conductividad correspondiente < 10 mS/cm (25 °C) y un pH de 6 - 9 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato). La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna empaquetada con Q-Sepharose XL (GE Healthcare). La columna se lava con una solución tampón de bajo contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente ascendente de NaCl (0 - 1 mol/L) en el mismo tampón.

20 d. Cromatografía de intercambio catiónico (CEC)

Una solución que contiene Factor H del complemento resultante de uno de los métodos de las secciones 2 a-f se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía de intercambio catiónico. En la sección 2 d se hace referencia a los ligandos y/o medios adecuados.

25 Las soluciones que contienen Factor H del complemento se formulan para obtener una conductividad correspondiente < 10 mS/cm (25 °C) y un pH de 5 - 8 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato). La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna empaquetada con SP-Sepharose FF (GE Healthcare). La columna se lava con una solución tampón de bajo contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente ascendente de NaCl (0 - 1 mol/L) en el mismo tampón.

30 e. Cromatografía de hidroxiapatita (HAC)

Una solución que contiene Factor H del complemento resultante de uno de los métodos de las secciones 2 a-f se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía de hidroxiapatita. En la sección 2 e se hace referencia a los ligandos y/o medios adecuados.

35 La fracción que actúa como fuente (lavado rico en Factor H del complemento procedente de la cromatografía de afinidad de heparina del sobrenadante al 8% procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o la Fracción III redisuelta procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o el Precipitado B redisuelto procedente de un fraccionamiento de Kistler/Nitschmann) se formula para obtener una conductividad correspondiente < 15 mS/cm (25 °C) y un pH de 5 - 8 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato). La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna empaquetada con HA Ultrogel (Pall). La columna se lava con una solución tampón de bajo contenido en sales (p. ej., 10 mmol/L de fosfato de potasio) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente ascendente de fosfato (0 - 1 mol/L).

f. Cromatografía de inmunoafinidad

45 Una solución que contiene Factor H del complemento resultante de uno de los métodos de las secciones 2 a-f se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía de inmunoafinidad. En la sección 2 f se hace referencia a los ligandos y/o medios adecuados.

5. Tecnologías de desactivación/eliminación de virus

Las realizaciones preferidas de la invención para conseguir la desactivación/eliminación de virus son combinaciones de los siguientes métodos aceptados de forma generalizada:

- a. Pasteurización (desactivación térmica de virus durante 10 h a 60 °C en estado líquido)
- b. Tratamiento con disolvente/detergente
- c. Nanofiltración

a. Pasteurización

La pasteurización a 60 °C durante 10 h es un método aceptado de forma generalizada para la desactivación de virus en derivados del plasma y se ha demostrado que es eficaz contra un amplio espectro de virus (Sofer G, "Virus Inactivation in the 1990s- and into the 21st Century", *Biopharm International*, suplemento de junio de 2003). La pasteurización se puede aplicar a cualquier preparado del Factor H del complemento purificado parcialmente o muy purificado obtenido a partir de cualquiera de los métodos descritos en la sección 1, 2, 3 o 5.

Las soluciones que contienen Factor H del complemento se formulan en soluciones tampón adecuadas (p. ej., tampón de citrato, tampón de fosfato, tris(hidroximetil)aminometano, HEPES, MOPS, etc.) que contienen NaCl con concentraciones de hasta 1 mol/L o sin NaCl con valores de pH de 5-9. Una de las realizaciones preferidas consiste en 50 mmol/L de citrato trisódico dihidratado de pH 5.5 + NaCl al 0.9% con una concentración de proteínas correspondiente a una Abs. a 280 nm = 15. Se añaden hasta 1.5 kg de sacarosa por L de solución y se disuelven. Se pueden añadir otros estabilizantes, p. ej., aminoácidos como la glicina y la lisina con concentraciones de hasta 1 mol/L o incluso superiores. La solución estabilizada de este modo se calienta a continuación hasta 60 °C y se mantiene a esa temperatura durante 10 h.

El Factor H del complemento purificado mediante HIC (de acuerdo con la sección 2 b) se formuló en NaCl al 0.9%, 50 mmol/L de citrato trisódico dihidratado de pH 5.5 con una concentración de proteínas correspondiente a una Abs. a 280 nm = 15. Se añadió 1 kg de sacarosa por L de solución y se disolvió. Se ajustó el valor del pH hasta 5.5. Posteriormente, la solución estabilizada se calentó hasta 60 °C y se mantuvo a esa temperatura durante 10 h. De forma correspondiente, la solución se enfrió hasta temperatura ambiente y se diluyó con un factor de 1:3 con tampón de citrato de pH 5.5.

Tabla 10: Pasteurización de un Factor H del complemento purificado mediante HIC

Muestra	Absorción a 280 nm	Factor H [mg/L]	Factor H [%]
Prepasteurización	9.5	10 550	100
Postpasteurización	9.6	10 000	95

b. Tratamiento con disolvente/detergente (S/D)

Además de la pasteurización, otro método aprobado para la desactivación de virus es el tratamiento con combinaciones de un disolvente, p. ej., fosfato de tri-*n*-butilo (TNB), y un detergente, p. ej., Tritón X-100, Polisorbato 80 (Tween 80) o colato sódico en estado líquido.

El tratamiento con S/D se puede aplicar a cualquiera de los preparados del Factor H del complemento purificados parcialmente o muy purificados obtenidos a partir de cualquiera de los métodos descritos en la sección 1, 2, 3 o 5, pero posteriormente se debe llevar a cabo un método adecuado para eliminar los reactivos S/D.

Se añade Tritón X-100 y fosfato de tri-*n*-butilo a una solución que contiene Factor H del complemento hasta obtener una concentración final de un 1% p/v de cada uno. La solución se agita durante 4-6 h a 25 - 30 °C. Posteriormente, se elimina el disolvente y el detergente mediante cromatografía, ya sea de un modo tal que el Factor H del complemento se una a la fase estacionaria y el disolvente y el detergente se eliminen por lavado en la fracción no unida o bien de un modo tal que el disolvente y el detergente se unan a un ligando adecuado (p. ej., C-18) dejando el Factor H del complemento en la fracción no unida.

c. Nanofiltración

La filtración de virus es la realización preferida para cumplir con las directrices reguladoras respecto a la implementación de principios/mecanismos de reducción de virus complementarios (diferentes modos de acción). La combinación de uno de los métodos de desactivación de virus mencionados anteriormente (4a o 4 b) con filtración como un método de reducción/eliminación de virus cumple perfectamente con dichos requisitos reguladores. Algunos filtros para la retención de virus adecuados son, p. ej., Planova™ de 35 nm, Planova™ de 20 nm (Asahi corporation), Ultipor DV 50 o DV 20 (Pall corporation), Virosart CPV (Sartorius), Viresolve NFR o NFP (Millipore).

La nanofiltración se puede aplicar a cualquiera de los preparados del Factor H del complemento purificados

parcialmente o muy purificados obtenidos a partir de cualquiera de los métodos descritos en la sección 1, 2, 3 o 5, donde la capacidad del filtro utilizado puede variar según sea el grado de pureza de la solución que se ha de filtrar.

5 Se filtró una solución del Factor H del complemento a través de un filtro de retención de virus aceptado, Planova™ de 20 nm (Asahi corporation). Aprox. 45 mL de una solución del Factor H del complemento purificada se filtraron a través de un módulo Planova 20 de 0.001 m² tras la prefiltración a través de un filtro de 0.1 μm Durapore de 12.5 cm² (Millipore).

Tabla 11: Filtración del Factor H del complemento purificado a través de un módulo Planova™ de 20 nm

Muestra	Absorción a 280 nm	Factor H [mg/L]	Factor H [%]
Antes de la filtración a través de 0.1 μm	4.7	5860	100
Filtrado a través de Planova de 20 nm	4.3	4220	72

6. Combinaciones adicionales de métodos de purificación

10 Con el fin de obtener un producto de Factor H del complemento de pureza muy elevada, cada uno de los métodos mencionados anteriormente y sus combinaciones se pueden o bien reemplazar o bien combinar con otros pasos de purificación cromatográfica.

a. Cromatografía de afinidad de heparina

15 Una solución que contiene Factor H del complemento resultante de uno de los métodos o repeticiones de los métodos o combinaciones de los métodos descritos en las secciones 1-4 se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía de afinidad de heparina. En la sección 2 a se hace referencia a los ligandos y/o medios adecuados.

20 Las soluciones que contienen Factor H del complemento se formulan para obtener una conductividad correspondiente < 25 mS/cm (25 °C) y un pH de 5 - 9 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato). La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna con una resina de afinidad de heparina (heparina inmovilizada en Toyopearl HW-65). La columna se lava con una solución tampón de bajo contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente ascendente de NaCl (0 - 1 mol/L) en el mismo tampón.

25 El eluato rico en Factor H del complemento procedente de una combinación de cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sepharose XL, cromatografía de interacción hidrófoba en Butil Sepharose FF y pasteurización se formuló hasta obtener una conductividad de aprox. 6 mS/cm y un valor de pH de 5.5. La solución se aplicó a una columna con una resina de afinidad de heparina (heparina inmovilizada en Toyopearl HW-65). La columna se lavó con una solución tampón de bajo contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico) y posteriormente el Factor H del complemento se eluyó utilizando un gradiente ascendente de NaCl (0 - 1 mol/L) en el mismo tampón.

30 **Tabla 12:** Purificación del Factor H del complemento mediante una combinación de cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba, pasteurización y una cromatografía de afinidad de heparina final

Muestra	Absorción a 280 nm	Factor H [mg/L]	Factor H [%]
Factor H procedente de AEC + HIC + pasteurización	3.0	3700	100
Eluato de la afinidad de heparina	6.2	8800	86

b. Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

35 Una solución que contiene Factor H del complemento resultante de uno de los métodos o repeticiones de los métodos o combinaciones de los métodos descritos en las secciones 1-4 se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía de interacción hidrófoba. En la sección 2 b se hace referencia a los ligandos y/o medios adecuados.

40 Las soluciones que contienen Factor H del complemento se formulan para obtener una conductividad correspondiente > 100 mS/cm (25 °C) y un pH de 5 - 9 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato). La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna empacada con Butil Sepharose FF (GE Healthcare). La columna se lava con una solución tampón de alto contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico, 2 mol/L de NaCl) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente descendente de NaCl (2 - 0 mol/L) en el mismo tampón.

c. Cromatografía de intercambio aniónico (AEC)

5 Una solución que contiene Factor H del complemento resultante de uno de los métodos o repeticiones de los métodos o combinaciones de los métodos descritos en las secciones 1-4 se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico. En la sección 2 c se hace referencia a los ligandos y/o medios adecuados.

10 Las soluciones que contienen Factor H del complemento se formulan para obtener una conductividad correspondiente < 10 mS/cm (25 °C) y un pH de 6 - 9 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato). La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna empacada con Q-Sepharose XL (GE Healthcare). La columna se lava con una solución tampón de bajo contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente ascendente de NaCl (0 - 1 mol/L) en el mismo tampón.

d. Cromatografía de intercambio catiónico (CEC)

15 Una solución que contiene Factor H del complemento resultante de uno de los métodos o repeticiones de los métodos o combinaciones de los métodos descritos en las secciones 1-4 se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía de intercambio catiónico. En la sección 2 d se hace referencia a los ligandos y/o medios adecuados.

20 Las soluciones que contienen Factor H del complemento se formulan para obtener una conductividad correspondiente < 10 mS/cm (25 °C) y un pH de 5 - 8 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato). La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna empacada con SP-Sepharose FF (GE Healthcare). La columna se lava con una solución tampón de bajo contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente ascendente de NaCl (0 - 1 mol/L) en el mismo tampón.

e. Cromatografía de hidroxiapatita (HAC)

25 Una solución que contiene Factor H del complemento resultante de uno de los métodos o repeticiones de los métodos o combinaciones de los métodos descritos en las secciones 1-4 se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía de hidroxiapatita. En la sección 2 e se hace referencia a los ligandos y/o medios adecuados.

30 La fracción que actúa como fuente (lavado rico en Factor H del complemento procedente de la cromatografía de afinidad de heparina del sobrenadante al 8% procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o la Fracción III redisuelta procedente de un fraccionamiento de Cohn/Oncley, o el Precipitado B redisuelto procedente de un fraccionamiento de Kistler/Nitschmann) se formula para obtener una conductividad correspondiente < 15 mS/cm (25 °C) y un pH de 5 - 8 en sistemas tampón adecuados (p. ej., solución salina o tampón de fosfato o tampón de citrato). La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna empacada con HA Ultrogel (Pall). La columna se lava con una solución tampón de bajo contenido en sales (p. ej., 10 mmol/L de fosfato de potasio) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente ascendente de fosfato (0 - 1 mol/L).

f. Cromatografía de inmutofinidad

40 Una solución que contiene Factor H del complemento resultante de uno de los métodos en las secciones 1-4 se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía de inmutofinidad. En la sección 2 f se hace referencia a los ligandos y/o medios adecuados.

7. Formulaciones del Factor H del complemento

45 Con el fin de obtener preparados del Factor H del complemento terapéuticos física y químicamente estables, de modo que estos preparados se puedan almacenar a, p. ej., 2-8 °C o temperaturas superiores y se puedan manipular, reconstituir y utilizar a temperatura ambiente (p. ej., 18-28 °C), el Factor H del complemento purificado (de acuerdo con las secciones 1.-5.) se puede formular junto con excipientes y estabilizantes adecuados, y posteriormente se puede liofilizar.

Los excipientes y estabilizantes adecuados pueden ser cualquier sustancia o combinaciones de sustancias de los siguientes grupos:

50 Agentes espesantes
Crioprotectores
Lioprotectores
Modificadores de la tonicidad
Surfactantes/detergentes
Tampón

Antioxidantes

a. Agentes espesantes

- 5 Se pretende que la expresión “agentes espesantes”, tal como se utiliza en la presente, designe a agentes que proporcionan o contribuyen en la obtención de la estructura del producto liofilizado, dicho de otro modo, una masa liofilizada atractiva desde el punto de vista visual o un producto farmacéuticamente elegante y, opcionalmente, contribuyen en la estabilización de la sustancia activa.

Algunos ejemplos típicos de las sustancias utilizadas como agentes espesantes son, p. ej., manitol, glicina, sacarosa, lactosa. Los concentrados típicos se encuentran en el intervalo de 0-10% p/v.

b. Crioprotectores

- 10 Se pretende que el término “crioprotectores”, tal como se utiliza en la presente, designe a agentes que protegen a la sustancia activa frente a estrés o daños inducidos por la congelación.

Algunos ejemplos típicos de sustancias utilizadas como crioprotectores son, p. ej., polioles (manitol), sacáridos (sacarosa, trehalosa), surfactantes (polisorbato, polioxámero, polietilenglicol). Las concentraciones típicas se encuentran en el intervalo de 0-10% p/v.

15

c. Lioprotectores

Se pretende que el término “lioprotectores”, tal como se utiliza en la presente, designe a agentes que protegen a la sustancia activa frente a estrés o daños inducidos por la deshidratación (p. ej., debido a la eliminación parcial de la corteza de hidratación de una proteína) durante la liofilización.

- 20 Algunos ejemplos típicos de sustancias utilizadas como lioprotectores son, p. ej., sacarosa, trehalosa, glutamato de sodio, glicina, isoleucina, clorhidrato de lisina, fenilalanina y arginina. Las concentraciones típicas se encuentran en el intervalo de 0-10% p/v.

d. Modificadores de la tonicidad

- 25 Se pretende que la expresión “modificadores de la tonicidad”, tal como se utiliza en la presente, designe a agentes cuyo efecto consiste en que la tonicidad, es decir, la osmolalidad del preparado, se encuentre en el intervalo de los fluidos fisiológicos normales (p. ej., sangre o fluido peritoneal) con el fin de prevenir reacciones tras la administración debidas a concentraciones de iones diferentes entre el preparado y los fluidos fisiológicos.

Algunos ejemplos típicos de sustancias utilizadas como modificadores de la tonicidad son, p. ej., NaCl, dextrosa, glicerina, cloruro de calcio, cloruro de potasio.

- 30 e. Surfactantes/detergentes

Se pretende que la expresión “surfactantes/detergentes”, tal como se utiliza en la presente, designe a agentes que protegen a la sustancia activa frente a estrés o daños inducidos por la interfaz aire-solución o la interfaz solución-superficie.

- 35 Algunos ejemplos típicos de surfactantes/detergentes son, p. ej., los poloxámeros (p. ej., poloxámero 188), polisorbatos (p. ej., Tween 20, Tween 80), éteres laurílicos polioxietilenados (p. ej., Brij 35).

Las concentraciones típicas están comprendidas en el intervalo de aproximadamente un 0.001% a aproximadamente un 0.5%.

f. Tampón

- 40 Se pretende que el término “tampón”, tal como se utiliza en la presente, designe a agentes que mantienen el pH del preparado en un intervalo en el que la administración del preparado (p. ej., intravenosa o subcutánea) se tolera bien normalmente (p. ej., pH de 5 - 9) y, además, evitan cambios de pH y protegen a la sustancia activa frente a estrés o daños inducidos por el pH durante la liofilización.

Algunos ejemplos típicos de sustancias utilizadas como sustancias tampón son, p. ej., carbonato, fosfato, citrato, borato, trimetamina [(2-amino-2-hidroximetil-1,-3-propanodiol), TRIS], glicina.

- 45 g. Antioxidantes

Se pretende que el término “antioxidantes”, tal como se utiliza en la presente, designe a agentes que proporcionan al menos cierta reducción del estrés oxidativo o la degradación de la sustancia activa.

Algunos ejemplos típicos de sustancias utilizadas como antioxidantes son, p. ej., monoglicérol, glutatona, ácido cítrico, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio y sulfito de sodio.

Las concentraciones típicas están comprendidas en el intervalo de aproximadamente un 0.1% a aproximadamente un 1% (p/v).

5 **Tabla 13:** Composición de las formulaciones:

1. 0.85% de NaCl, 25 mmol/L de citrato trisódico dihidratado de pH 5-9, 1% p/v de glicina, 2% de glutamato sódico, 1% de arginina, 1% de isoleucina
2. 25 mmol/L de citrato trisódico dihidratado de pH 5-9, 1% p/v de glicina, 2% de glutamato sódico, 1% de arginina, 1% de isoleucina
3. 0.85% de NaCl, 25 mmol/L de citrato trisódico dihidratado de pH 5-9, 1% p/v de glicina, 2% de sacarosa, 1% de arginina, 1% de isoleucina
4. 0.85% de NaCl, 25 mmol/L de citrato trisódico dihidratado de pH 5-9, 1% p/v de glicina, 2% de trehalosa, 1% de arginina, 1% de isoleucina
5. 25 mmol/L de citrato trisódico dihidratado de pH 5-9, 1% p/v de glicina, 2% de sacarosa, 1% de arginina, 1% de isoleucina
6. 25 mmol/L de citrato trisódico dihidratado de pH 5-9, 1% p/v de glicina, 2% de trehalosa, 1% de arginina, 1% de isoleucina
7. 0.85% de NaCl, 25 mmol/L de citrato trisódico dihidratado de pH 5-9, 1% p/v de glicina, 2% de glutamato sódico, 0.1% de Tween 80
8. 0.85% de NaCl, 25 mmol/L de citrato trisódico dihidratado de pH 5-9, 1% p/v de glicina, 2% de sacarosa, 0.1% de Tween 80
9. 0.85% de NaCl, 25 mmol/L de citrato trisódico dihidratado de pH 5-9, 1% p/v de glicina, 2% de trehalosa, 0.1% de Tween 80
10. 25 mmol/L de citrato trisódico dihidratado de pH 5-9, 1% p/v de glicina, 2% de glutamato sódico, 0.1% de Tween 80
11. 25 mmol/L de citrato trisódico dihidratado de pH 5-9, 1% p/v de glicina, 2% de sacarosa, 0.1% de Tween 80
12. 25 mmol/L de citrato trisódico dihidratado de pH 5-9, 1% p/v de glicina, 2% de trehalosa, 0.1% de Tween 80

La solución que comprende el Factor H del complemento purificado de acuerdo con los métodos descritos en las secciones 1-5 se concentra hasta obtener la concentración final deseada utilizando medios de ultrafiltración (p. ej., TFF empleando membranas con un corte de 100 kDa) y se somete a diafiltración frente a 5-10 intercambios de una solución tampón adecuada (p. ej., 0.85% de NaCl, 25 mmol/L de citrato trisódico dihidratado de pH 5-9).
 10 Posteriormente, se añaden excipientes adicionales de acuerdo con los ejemplos en la sección 6 a – g (p. ej., 1% p/v de glicina, 2% de sacarosa, 1% de arginina, 1% de isoleucina) y se disuelven completamente. La solución de Factor H del complemento formulada se filtra a continuación a través de un filtro de grado de esterilización como prerrequisito para los procedimientos posteriores de rellenado y acabado.

8. Preparados de Factor H del complemento (liofilización)

- 15 Con el fin de obtener preparados de Factor H del complemento terapéuticos física y químicamente estables según se ha descrito en la sección 6, el contenido de humedad residual del producto liofilizado debe ser lo suficientemente bajo para proteger a la sustancia activa frente a la degradación. Se puede obtener un contenido de humedad residual $\leq 3\%$ mediante procedimientos de liofilización adecuados y este no se debería sobrepasar en este contexto.

20 El preparado de Factor H del complemento formulado se introduce en viales adecuados para liofilización. Los viales se colocan en un liofilizador adecuado y el preparado se congela con una temperatura de la bandeja de $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4-5 h (aprox. $0.5\text{-}1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) en condiciones de presión ambiental. Posteriormente, la presión de la cámara se reduce hasta 0.15 mbar durante 30-60 min y la temperatura de la bandeja se incrementa hasta $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30-60 min. De forma correspondiente, después de 10-15 h, la temperatura de la bandeja se incrementa adicionalmente hasta $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantiene constante durante 10-15 h más. Posteriormente, la temperatura de la bandeja se
 25 incrementa adicionalmente hasta $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantiene durante 24-30 h. Normalmente, durante este paso, la temperatura del producto alcanza la temperatura de la bandeja después de aprox. de $1/2$ a $1/3$ del tiempo. A continuación, se consigue el secado secundario incrementando la temperatura de la bandeja hasta $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ y manteniéndola constante durante 24-30 h.

9. Ejemplo de una realización preferida

- 5 En una realización preferida, el sobrenadante al 8% (2400-2700 L) de un fraccionamiento de Cohn/Oncley modificado se somete a una cromatografía de afinidad de heparina. Se añaden aprox. 0.08 L de resina de afinidad de heparina (heparina inmovilizada sobre Toyopearl HW-65) por litro de sobrenadante al 8% y la suspensión se agita durante aprox. 1 h con refrigeración. Posteriormente, la resina se recupera por filtración y se transfiere a una columna de cromatografía. El Factor H del complemento se eluye de la columna utilizando una solución que contiene aprox. 0.25 mol/L de citrato trisódico dihidratado a un pH de 6.5, mientras que la ATIII permanece unida a la columna.
- 10 El lavado de citrato rico en Factor H del complemento (400-700 L; 32 mS/cm, pH de 6.2) se calienta hasta 30 °C. Se añade un concentrado de PEG 4000 (25% p/v) hasta obtener una concentración final de PEG de un 7.5% p/v. La mezcla se agita durante 30 min. (30 °C) y se filtra a través de una combinación de filtros de profundidad tras la adición de 10 g/L del adyuvante de filtración perlita.
- 15 El filtrado de PEG que contiene el Factor H del complemento se formula hasta obtener una conductividad de 5-6 mS/cm (25 °C) y un pH de 9 en 25 mmol/L de tampón de TRIS. La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna empaquetada con 80 L de Q-Sepharose XL (GE Healthcare). La columna se lava con una solución tampón de bajo contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente por pasos de NaCl (0.3 mol/L) en el mismo tampón.
- 20 El eluato de AEC rico en Factor H del complemento (100-300 L) se formula hasta obtener una conductividad de 135 mS/cm (25 °C) y un pH de 5.5 en tampón de citrato. La solución acondicionada de este modo se aplica a continuación a una columna empaquetada con 80 L de Butil Sepharose FF (GE Healthcare). La columna se lava con una solución tampón de alto contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico, 2 mol/L de NaCl) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente descendente de NaCl (2 - 0 mol/L) en el mismo tampón.
- 25 El Factor H del complemento purificado mediante HIC (80-200 L) se formula para obtener un 0.9% de NaCl, 50 mmol/L de citrato trisódico dihidratado de pH 5.5 con una concentración de proteínas correspondiente a una Abs. a 280 nm = 15 mediante ultrafiltración de flujo tangencial (TF-UF) utilizando membranas con un corte de 100 kDa. Se añade 1 kg de sacarosa por L de solución y se disuelve. Se ajusta el valor de pH hasta 5.5. Posteriormente, la solución estabilizada se calienta hasta 60 °C y se mantiene a esa temperatura durante 10 h. De forma correspondiente, la solución se enfría hasta temperatura ambiente y se diluye con un factor de 1:3 con tampón de citrato de pH 5.5.
- 30 A continuación, la solución que contiene Factor H del complemento pasteurizado diluido (aprox. 6 mS/cm; pH de 5.5) se aplica a una columna con una resina de afinidad de heparina (40 L de heparina inmovilizada en Toyopearl HW-65). La columna se lava con una solución tampón de bajo contenido en sales (25 mmol/L de citrato trisódico) y posteriormente el Factor H del complemento se eluye utilizando un gradiente ascendente de NaCl (0 - 1 mol/L) en el mismo tampón.
- 35 Tras la cromatografía de afinidad de heparina, la solución de Factor H del complemento se filtra a través de un filtro de retención de virus aceptado, Planova™ 20 nm (Asahi corporation). Se filtran como máximo 100 L de solución de Factor H del complemento purificado a través de un módulo Planova 20 de 1 m² tras la prefiltración a través de uno o más cartuchos de filtración de PVDF de 0.1 µm y 10" (0.7 m²) (p. ej., Durapore, Millipore).
- 40 Posteriormente, la solución de Factor H del complemento purificado se somete a diafiltración y se concentra mediante TF-UF hasta obtener una concentración de al menos 50 mg/mL* en 25 mmol/L de citrato trisódico de pH 7 + 0.85% de NaCl. Se añaden los excipientes (1% p/v de glicina, 2% de glutamato sódico, 1% de arginina, 1% de isoleucina) y se ajusta el pH hasta 8. La solución (2000-4000 mL) se filtra a través de un filtro de grado de esterilización (≤ 0.22 µm) y se introduce en los envases finales (p. ej., viales de inyección de vidrio de 30 mL de tipo II, con tapones para liofilización de goma de clorobutilo).
- 45 Los viales rellenos se liofilizan de forma correspondiente, según se ha descrito en la sección 7.

* se determina utilizando un preparado de referencia del Factor H del complemento puro como calibrador

Tabla 14: Pureza (determinada mediante HPLC de exclusión por tamaño*) de los intermedios y del preparado formulado final de Factor H del complemento obtenidos de la fabricación a gran escala

ES 2 595 059 T3

Muestra	Impurezas de PM elevado ¹⁾ [% de área]	Factor H [% de área]	Impurezas de PM bajo ²⁾ [% de área]
Filtrado de PEG 4000	0.5	17.9	81.6
Eluato de AEC	----	53.1	46.9
Eluato de HIC	0.2	83.1	16.6
Pospasteurización	6.0	84.6	9.4
Eluato de AFC de heparina	2.9	93.1	3.9
Masa formulada (aprox. 50 mg/mL)	2.9	95.7	1.4
* TSK G3000 SW _{XL} ¹⁾ Tiempo de retención < Factor H ²⁾ Tiempo de retención > Factor H			

REIVINDICACIONES

1. Un método para la purificación de Factor H del complemento en una solución que comprende los pasos de:

- 5 a) proporcionar una fracción que comprende Factor H del complemento mediante la precipitación fraccionada a gran escala de suero o plasma humano con etanol, donde mediante dicho proceso de precipitación fraccionada a gran escala se produce al menos una proteína farmacéutica adicional que se puede obtener comercialmente;
- b) purificar adicionalmente el Factor H del complemento mediante al menos un método de purificación seleccionado del grupo siguiente:
 - 10 I. Cromatografía de afinidad de heparina
 - II. Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)
 - III. Cromatografía de intercambio aniónico (AEC)
 - IV. Cromatografía de intercambio catiónico (CEC)
 - V. Cromatografía de hidroxapatita (HAC)
 - 15 VI. Cromatografía de inmutofinidad
- c) tratar la fracción que contiene el Factor H del complemento al menos una vez antes, durante o después del paso b) de dicho proceso de purificación con un método de desactivación y/o eliminación de virus/patógenos;

donde la purificación del Factor H del complemento comprende los siguientes pasos del proceso:

- 20 I. una cromatografía de intercambio aniónico inicial
- II. seguida de una cromatografía de interacción hidrófoba
- III. seguida de pasteurización
- IV. seguida de una cromatografía de afinidad de heparina
- V. seguida de nanofiltración.

25 **2.** El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el método de purificación del paso b) se repite una o varias veces o se combina con otro método de purificación.

30 **3.** El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicha proteína farmacéutica adicional que se puede obtener comercialmente se selecciona del grupo constituido por albúmina, antitrombina III, Factor VIII, Factor IX, Fibrinógeno, Factor XIII, trombina (FIIa), FVII/IIa, preparados de complejos de protrombina (PPSB), inhibidor de la proteinasa alfa-1, inhibidor C1, inmunoglobulinas, transferrina y butirilcolinesterasa.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1-3, donde el método de desactivación o eliminación de virus/patógenos es pasteurización, tratamiento con disolvente/detergente y/o nanofiltración.

35 **5.** El método de acuerdo con la reivindicación 1-4, donde la fracción que comprende el Factor H del complemento es el sobrenadante en etanol al 8% (Fracción I en el fraccionamiento de Cohn/Oncley) o la Fracción III (fraccionamiento de Cohn/Oncley) o el Precipitado B en el fraccionamiento de Kistler/Nitschmann.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1-5, donde el proceso de purificación comprende adicionalmente un paso de eliminación de lípidos y/o la inhibición y/o eliminación de una proteasa.

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 1-6, donde la fracción que comprende el Factor H del complemento es una fracción residual.

40

Figura 1: Representación esquemática de un fraccionamiento de plasma industrial de Cohn/Oncley modificado

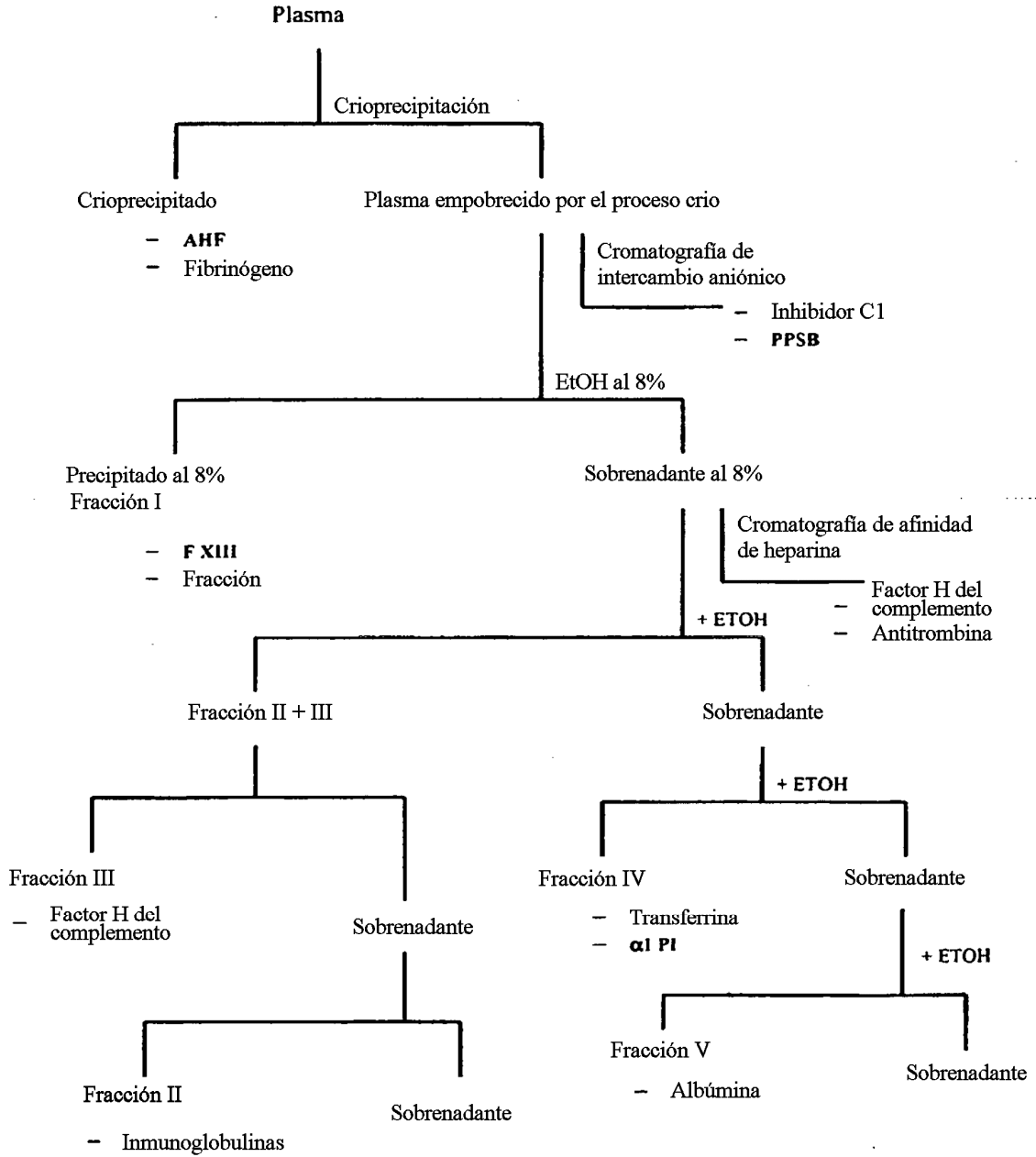


Figura 2: Representación esquemática de un fraccionamiento de plasma industrial de Kistler/Nitschmann modificado

