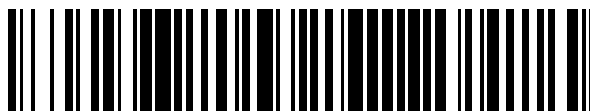


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 598 007**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/36** (2006.01)

**C07K 14/745** (2006.01)

**C07K 14/75** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2010 PCT/IB2010/055263**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2011 WO11061705**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2010 E 10787915 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2501713**

54 Título: **Procedimiento de tratamiento del plasma sanguíneo que comprende una etapa de lavado por dispersión**

30 Prioridad:

**18.11.2009 FR 0958145**

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

**24.01.2017**

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU  
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES  
(100.0%)**

**3 avenue des Tropiques ZA de Courtaboeuf  
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

**TRUSGNICH, THIERRY**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 598 007 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

Procedimiento de tratamiento del plasma sanguíneo que comprende una etapa de lavado por dispersión

## 5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento del plasma sanguíneo que comprende las etapas de precipitación etanólica del plasma o de una fracción de plasma, de recuperación del precipitado, de lavado de dicho precipitado, de recuperación de una pasta plasmática lavada, de solubilización de dicha pasta plasmática

10 lavada.

Estado de la técnica

15 El fibrinógeno es una proteína esencial de la coagulación sanguínea, ya que su polimerización en fibrina insoluble formada al final de la cascada de reacciones que controlan la coagulación, conduce a la formación de un coágulo que obtura la brecha vascular, responsable del sangrado. La colocación del coágulo es así esencial para asegurar la detención del sangrado. Además, la fibrina formada a nivel de la herida constituye una red fibrilar que asegura la reparación tisular (cicatrización).

20 Las deficiencias congénitas de fibrinógenos pueden conducir a graves patologías. Para curar estas deficiencias, es necesario disponer de concentrados de fibrinógeno que pueden ser administrados a pacientes en tratamiento. Otras patologías también se pueden curar con aportes de fibrinógeno, en particular en caso de pérdidas masivas de sangre (cirugías, traumatismos, etc.), o tras una coagulopatía de consumo descompensado (CIVD).

25 Por otro lado, los pegamentos biológicos activables por la trombina, que contiene fibrinógeno como constituyente principal y de Factor XIII (FXIII), son eficazmente utilizados para la reparación tisular durante usos clínicos, tales como injertos de piel, suturas nerviosas o arteriales, como se describe, por ejemplo, en las patentes EP 0 305 243, FR 2 448 900 y FR 2 448 901.

30 La presencia de Factor XIII o transglutaminasa en estos productos contribuye a estabilizar la fibrina por la creación de enlaces covalentes intercatenarios, que la hacen insoluble. En algunos casos, estos productos son obtenidos según unos procedimientos de producción de fibrinógeno bastante complejos que necesitan un aporte exógeno de Factor XIII purificado, con el fin de que puedan realizar su función terapéutica.

35 En consecuencia, la provisión de concentrados de fibrinógeno, de pegamentos biológicos, y de Factor XIII, en particular con fines terapéuticos, requiere unas técnicas de purificación que conducen a estos productos, no sólo suficientemente purificados de contaminantes de naturaleza diversa, tales como las proteínas acompañantes o coprecipitadas, los anticuerpos o las proteasas, sino además asegurados en el plano viral.

40 El aislamiento de fracciones enriquecidas en fibrinógeno, que contiene eventualmente FXIII, a partir del plasma, se conoce y se ha descrito inicialmente por lo trabajos de Cohn y Nitschmann (Cohn *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 68, 459, 1946 y Kistler *et al.*, Vox Sang., 7, 1962, 414-424). Unos métodos más recientes asocian unas técnicas de precipitación de diferentes fuentes de plasma y unas técnicas de filtración, de cromatografía, de inactivación viral, etc. Se pueden citar, a título de ejemplo, las solicitudes de patentes EP 0 359 593, US 5 099 003, EP 0 305 243, FR

45 2 448 900 y FR 2 448 901.

Parece, no obstante, que la mayoría de los procedimientos conocidos en el estado de la técnica implican la utilización de cadenas de producción distintas y, por lo tanto, de métodos diferentes para producir unos concentrados o unas composiciones de fibrinógeno, de pegamento biológico o enriquecido en fibrinógeno y que contiene otras proteínas acompañantes como el FXIII, el factor VIII, la fibronectina, el factor von Willebrand, etc. La mayoría de los procedimientos conocidos son, por lo tanto, poco adecuados para una realización a escala industrial, en particular cuando existe una necesidad conjunta de pegamento biológico, de fibrogeno y de factor XIII. La complejidad de realización de estos procedimientos de purificación a escala industrial aumenta también cuando las proteínas de interés están destinadas a un uso terapéutico y deben ser sometidas a tratamientos de desactivación

55 y/o de eliminación de los virus y otros contaminantes indeseables, como por ejemplo el príon.

La solicitud de patente EP 1 739 093 describe un procedimiento único que permite separar las proteínas fibrinógena, Factor XIII y pegamento biológico de una fracción plasmática solubilizada que comprende fibrinógeno y Factor XIII, y que conduce a la preparación de concentrados liofilizados de dichas proteínas. El procedimiento descrito en la solicitud EP 1 739 093 comprende en particular las etapas de purificación cromatográfica de una fracción plasmática solubilizada en un intercambiador de aniones de tipo base débil en condiciones que permiten la retención del pegamento biológico, de elución específica de este pegamento, de separación de FXIII a partir de fibrinógeno por adición de al menos un agente químico que precipita FXIII, de recuperación de la solución resultante de sobrenadante de fibrinógeno purificado y de diafiltración de las soluciones de fibrinógeno, de pegamento biológico y de FXIII puesto de nuevo en solución, seguida de una liofilización de dichas soluciones. El procedimiento descrito en la solicitud de patente EP 1 739 093 puede también comprender al menos una etapa de tratamiento de inactivación

60 65

viral y/o de eliminación de virus y de contaminantes, siendo el tratamiento seleccionado entre el tratamiento químico de inactivación viral, la nanofiltración y el tratamiento térmico de inactivación viral en seco. Sin embargo, las técnicas de re-suspensión utilizadas en los procedimientos conocidos en el estado de la técnica no son totalmente satisfactorias. En efecto, en estos procedimientos conocidos en el estado de la técnica, el fenómeno de cizallamiento que se produce durante la re-suspensión puede generar una degradación de las proteínas de interés. Existe por lo tanto una alta necesidad de la realización de mejoras técnicas susceptibles de disminuir la degradación de las proteínas de interés y aumentar el grado de pureza de las proteínas extraídas.

Resumen de la invención

La solicitante ha descubierto, de manera sorprendente, que la puesta en práctica de una etapa de lavado por dispersión durante la fase preliminar de preparación de la fracción plasmática solubilizada utilizada como materia prima en el ámbito del procedimiento, por ejemplo, de la solicitud EP 1 739 093, permite mejorar de manera significativa la calidad del lavado con respecto a los procedimientos del estado de la técnica, que describen sólo una etapa de lavado por re-suspensión. Parece que la puesta en práctica de una etapa de lavado por dispersión conduce a un aumento del grado de pureza del fibrinógeno en la fracción plasmática solubilizada y, posteriormente, en los concentrados de fibrinógeno y de pegamento biológico que resultan de la aplicación del procedimiento, por ejemplo, de la solicitud EP 1 739 093.

Los beneficios obtenidos por la invención no están limitados al único procedimiento objeto de la solicitud EP 1 739 093, sino que se obtendrán con los procedimientos que utilizan la fracción etanólica (fracción I de Cohn).

La presente solicitud describe por lo tanto un procedimiento de tratamiento del plasma sanguíneo que comprende las etapas de:

- a) precipitación etanólica del plasma o de una fracción de plasma;
- b) recuperación del precipitado formado en la etapa a);
- c) lavado de dicho precipitado por dispersión;
- d) recuperación de una pasta plasmática lavada; y
- e) solubilización de dicha pasta plasmática lavada.

El lavado por dispersión de la etapa c) es realizado, preferentemente, utilizando un dispersor de tipo roto/estator. Ventajosamente, el dispersor utilizado es un dispersor en línea, siendo el precipitado de la etapa b) alimentado en la entrada axial del dispersor y siendo el producto lavado expulsado por la salida radial del dispersor.

El procedimiento de la solicitud puede también comprender las etapas adicionales de:

- f) tratamiento de dicha pasta plasmática solubilizada por hidróxido de aluminio y/o tratamiento de dicha pasta plasmática solubilizada a baja temperatura; y
- g) obtención de una fracción plasmática soluble por filtración clarificante y/o esterilizante del sobrenadante que resulta de la etapa f).

El procedimiento tal como se describe puede finalmente comprender unas etapas suplementarias de:

- h) purificación cromatográfica de la fracción plasmática soluble de la etapa g) en una resina de tipo intercambiador de aniones de tipo base débil previamente equilibrado por un tampón de fuerza iónica predeterminada de pH básico, en condiciones que permiten la retención del pegamento biológico, siendo dicho pegamento biológico eluido por aumento de la fuerza iónica de dicho tampón;
- i) precipitación de FXIII a partir de todo o parte del eluato de pegamento biológico obtenido en la etapa h) por adición de al menos un agente químico que precipita el FXIII;
- j) recuperación de una solución de fibrinógeno purificado que corresponde al sobrenadante de la etapa i); y
- k) diafiltración de las soluciones de fibrinógeno, y/o de pegamento biológico y/o de FXIII puesto de nuevo en solución, seguida de una liofilización de dichas soluciones.

Así, el procedimiento descubierto por la solicitante, que comprende la puesta en práctica de una etapa de lavado por dispersión, permite así obtener unos concentrados de fibrinógeno, de factor XIII y/o de pegamento biológico liofilizados, altamente purificados, sustancialmente desprovistos de proteínas co-purificadas y de contaminantes indeseables. En efecto, la etapa de lavado por dispersión conduce a un mejor lavado de la fracción plasmática inicial

que comprende las proteínas de interés, y en particular el fibrinógeno, y conduce a una mejora significativa del grado de pureza de estos compuestos durante unas etapas posteriores del procedimiento, con respecto a los lavados por simple re-suspensión descritos en el estado de la técnica.

5 La puesta en práctica de una etapa de lavado por dispersión conduce, por lo tanto, a una pureza más elevada, en un procedimiento simple, rápido y poco costoso, y asegura una rentabilización mejorada de la materia prima (plasma o fracción de plasma) a escala industrial. Esto da como resultado una optimización significativa de la producción de pegamento biológico, de Factor XIII y/o de fibrinógeno, reduciendo al mismo tiempo los costes de producción asociados a ello.

10 El procedimiento de la invención permite además obtener unos concentrados de proteínas liofilizadas y altamente purificadas, a partir de una materia prima plasmática que contiene preferiblemente fibrinógeno y Factor XIII, permaneciendo compatible con al menos un tratamiento de inactivación y/o de eliminación de los virus y de otros contaminantes indeseables (tales como unos polímeros, unos agregados o unos priones).

15 Breve descripción de los dibujos

La única figura es una representación esquemática de un dispersor roto/estator.

20 Descripción detallada de modos de realización de la invención

La presente invención se refiere por lo tanto a un procedimiento de tratamiento del plasma sanguíneo que comprende las etapas de:

25 a) precipitación etanólica del plasma o de una fracción de plasma;

b) recuperación del precipitado formado en la etapa a);

30 c) lavado de dicho precipitado por dispersión, utilizando un dispersor de tipo rotor/estator;

d) recuperación de una pasta plasmática lavada;

e) solubilización de dicha pasta plasmática lavada.

35 El procedimiento de la invención se puede realizar a partir de fuentes variadas de materia prima plasmática, y en particular a partir de fuentes que contienen fibrinógeno y Factor XIII. Este procedimiento se puede realizar así directamente a partir del plasma utilizando el método de fraccionamiento de Cohn, utilizando alcohol frío (Cohn *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 68, 459, 1946 y Kistler *et al.*, Vox Sang., 7, 1962, 414-424).

40 Ventajosamente, las etapas b) y d) del procedimiento de la invención se realizan por centrifugación.

45 En el sentido de la presente invención, el término "dispersión" designa la separación de las partículas de precipitado etanólico y su distribución homogénea o sustancialmente homogénea en el medio constituido por el tampón de lavado. Esta dispersión se distingue de los métodos de re-suspensión descritos en el estado de la técnica, en particular, por que estos últimos no permiten distribuir las partículas de manera homogénea.

50 Un dispersor de tipo rotor/estator comprende generalmente al menos un rotor y al menos un estator dentados, que forman un conjunto a gran velocidad de cizallamiento. El producto (aquí el precipitado etanólico mezclado con el tampón de lavado) penetra en la zona de dispersión entre las ranuras del rotor dentado y vuelve a salir por las ranuras de la corona del estator, asegurándose el efecto de bombeado por la máquina en sí. La corona interior del rotor aumenta la velocidad de paso del producto, la corona del estator la frena bruscamente, favoreciendo la dispersión final del producto. Las fuertes turbulencias en la ranura de cizallamiento trituran y dispersan con eficacia las partículas sólidas en una distribución homogénea. La geometría del rotor y del estator puede ser adaptada a las condiciones de dispersión del producto. Tal dispersor está representado en la única figura.

55 El dispersor, en particular rotor/estator y en particular en línea, permite por lo tanto obtener una solución homogénea o sustancialmente homogénea, con una dispersión muy fina, homogénea o sustancialmente homogénea del precipitado etanólico en el tampón de lavado, y contribuye así a la eliminación de una proporción más elevada de contaminantes proteicos.

60 Aunque la utilización de dispersores de tipo rotor/stator es conocido en el estado de la técnica para la preparación de emulsiones, para la puesta en suspensión de pigmentos, para la incorporación de detergentes en una solución, para la fabricación rápida de soluciones coloidales y para la homogeneización de polvos y otros productos similares, conviene sin embargo señalar que la utilización de tales dispersores no está descrita en el ámbito de procedimientos de purificación de proteínas plasmáticas.

65

En efecto, se sabe que la utilización de un dispersor provoca un calentamiento de la solución o de la suspensión preparada, y que tal dispersor no puede ser utilizado en un recipiente termostatado. En consecuencia, parece probable, a fecha de la presente invención, considerar que la utilización de un dispersor en el ámbito de procedimientos de preparación de productos plasmáticos conduciría a un aumento de la temperatura, provocando así la degradación de las proteínas plasmáticas.

Ahora bien, la solicitante ha observado de manera sorprendente que la utilización de un dispersor reduce el tiempo necesario para la dispersión y disminuye en realidad el calentamiento de esta última. Así, a diferencia del prejuicio técnico en vigor, y de manera sorprendente, la utilización de un dispersor se muestra particularmente apropiada en el ámbito de un procedimiento de purificación de proteínas plasmáticas, en la medida en la que no genera degradación ninguna del producto.

Por otro lado, la solicitante ha observado también que la utilización de un dispersor conduce a una disminución significativa de la cantidad de proteínas contaminantes.

En un modo de realización preferido, la etapa de lavado por dispersión de la etapa c) del procedimiento de la invención se lleva a cabo utilizando un dispersor en línea. En este caso particular, el dispersor de tipo rotor/estator, está montado en la misma línea de producción que los otros elementos industriales requeridos para llevar a cabo el procedimiento de purificación. El precipitado de la etapa b) se encuentra por lo tanto suministrado, preferiblemente con el tampón de lavado, en la entrada axial del dispersor en línea y el producto lavado, que corresponde a una dispersión sustancialmente homogénea del precipitado etanólico en el tampón de lavado, se expulsa a la salida radial del dispersor en línea.

La utilización de un dispersor en línea ofrece además todas las garantías de asepsia, ya que la máquina está diseñada para un desmontaje simple y una limpieza fácil, y se puede integrar en un sistema NEP (limpieza en el lugar).

Como se ha discutido anteriormente, el lavado del precipitado etanólico por un dispersor durante la etapa c) del procedimiento de la invención conduce a la obtención de una suspensión homogénea o sustancialmente homogénea (un homogeneizado) del precipitado etanólico en el tampón de lavado utilizado. Esta suspensión homogénea o sustancialmente homogénea se puede caracterizar por un control visual que permite verificar la ausencia de aglomerado en la suspensión.

En un modo de realización particular, la etapa c) de la presente invención se realiza utilizando un recipiente equipado con un móvil de agitación de tipo pala defloculadora. Este móvil de agitación permite realizar la dispersión primaria, que conduce a una pasta defloculada pero no homogénea. El móvil de agitación está acoplado a un sistema de dispersión en línea, que permite realizar la dispersión secundaria que conduce a una suspensión fina y homogénea.

En un modo de realización preferido, la recuperación del precipitado efectuada en la etapa b) y/o la recuperación de la pasta plasmática efectuada en la etapa d) se llevan a cabo por centrifugación. Preferiblemente, la recuperación de la pasta plasmática en la etapa d) se efectúa por utilización de una centrifugadora de inyección. En este caso particular, el precipitado lavado por dispersión de la etapa c) se introduce en una centrifugadora industrial mediante inyectores cuyo diámetro está calibrado en función del tamaño de las partículas en suspensión. En un modo de realización preferido, la centrifugadora de inyección es una centrifugadora de tipo "Sharpless AS 16" o "westfalia separator", que posee unos inyectores específicos calibrados en función del separador utilizado (2 a 4 mm).

El lavado por dispersión de la etapa c) permite obtener una suspensión que comprende partículas muy finas de precipitado etanólico en el tampón de lavado. Esto da como resultado que la suspensión sustancialmente homogénea formada demuestra ser particularmente muy adecuada para la utilización de una centrifugadora de inyectores, en la medida en la que previene ventajosamente la obstrucción de los inyectores de la centrifugadora.

En un modo de realización preferido, la solubilización de la pasta plasmática se efectúa en un tampón que comprende cloruro de sodio 0,06-0,18 M, citrato trisódico 0,005-0,02 M y arginina 0,02-0,08 M, a pH 7,3 a 7,5.

En un modo de realización preferido, el precipitado formado por la precipitación etanólica se lava por dispersión con un tampón constituido de una mezcla de glicina 0,5-1,5 M, de citrato trisódico 0,01-0,1 M y de etanol 5,0-8,0% (v/v) a un pH de 6,7-6,9.

En un modo de realización preferido, el procedimiento de la invención comprende las etapas adicionales de:

f) tratamiento de dicha pasta plasmática solubilizada por hidróxido de aluminio y/o tratamiento de dicha pasta plasmática solubilizada a baja temperatura;

g) obtención de una fracción plasmática soluble por filtración clarificante y/o esterilizante del sobrenadante que resulta de la etapa f).

- 5 La adición de hidróxido de aluminio durante la etapa f) asegura en particular la eliminación de las proteínas indeseables, tales como los factores II (FII), VII (FVII), IX (FIX) y X (FX). El sobrenadante que resulta del tratamiento de la pasta plasmática solubilizada, también designado "fracción plasmática soluble" en la presente solicitud, se purifica por al menos una filtración clarificante y/o esterilizante. La fracción plasmática soluble puede también sufrir una filtración en profundidad con el objetivo de permitir la retención del hidróxido de aluminio.
- 10 La filtración clarificante permite eliminar las partículas contaminantes insolubles. Las filtraciones clarificante y esterilizante se llevan a cabo generalmente por la utilización de filtros, por ejemplo de 0,8 a 0,1  $\mu\text{m}$ . Al menos una filtración clarificante se realiza ventajosamente en forma de una filtración sobre filtros de fibras de celulosa de 0,65  $\mu\text{m}$ . En un modo de realización preferido, se efectúa al menos una filtración esterilizante sobre filtros de 0,2  $\mu\text{m}$ .
- 15 La fracción plasmática soluble obtenida al final de la etapa g) se puede utilizar directamente o puede, cuando es necesario, ser congelada a la espera de la puesta en práctica de eventuales etapas complementarias de purificación.
- 20 La puesta en práctica del procedimiento de tratamiento de plasma sanguíneo que comprende una etapa de lavado por dispersión permite ventajosamente obtener un grado de pureza del fibrinógeno en la fracción plasmática soluble de al menos un 80%, preferentemente de al menos un 85%, más preferiblemente de al menos un 90%.
- 25 La utilización de un sistema de dispersión en línea durante la etapa de lavado mejora, en particular, el enriquecimiento de fibrinógeno en la fase de fracción plasmática soluble.
- Esta tecnología permite obtener unos resultados conformes y reproducibles en términos de homogeneidad de la suspensión durante la dispersión en línea y de enriquecimiento en fibrinógeno durante esta etapa de lavado y, a continuación, en las etapas ulteriores, sin que la proteína de interés sufra una degradación.
- 30 En un modo de realización preferido, el procedimiento de tratamiento del plasma sanguíneo de la invención comprende las etapas adicionales de:
- 35 h) purificación cromatográfica de la fracción plasmática soluble de la etapa g) en una resina de tipo intercambiador de aniones de tipo base débil previamente equilibrado por un tampón de fuerza iónica predeterminada de pH básico, en condiciones que permiten la retención del pegamento biológico, siendo dicho pegamento eluido por aumento de la fuerza iónica de dicho tampón;
- 40 i) precipitación de FXIII a partir de todo o parte del eluato de pegamento biológico por adición de al menos un agente químico que precipita el FXIII;
- 45 j) recuperación de una solución de fibrinógeno purificado que corresponde al sobrenadante de la etapa i); y
- k) diafiltración de las soluciones de fibrinógeno y/o de pegamento biológico y/o de FXIII vuelto a poner en solución, seguida de una liofilización de dichas soluciones.
- 50 La purificación cromatográfica de la fracción plasmática soluble (etapa h)) se puede efectuar en cualquier matriz a base de polímero natural o sintético, resina o gel, sobre la cual se injertan unos grupos intercambiadores de aniones de tipo base débil, tal como el DEAE. Los soportes cromatográficos clásicos de este tipo están disponibles bajo las denominaciones DEAE-Sepharose CL-6B, DEAE-Trisacryl LS, Fractogel TSK-DEAE 650 M o S, DEAE-Macroprep (Bio-Rad, Francia) etc.
- 55 El tampón de equilibrado del intercambiador de aniones presenta una fuerza iónica predeterminada y debe estar a un pH básico. La fuerza iónica es típicamente inferior al valor de 0,2 y, preferentemente, está situada en el intervalo de valor que va de 0,06 a 0,2, en particular de 0,08 a 0,15.
- Ésta se ajusta preferentemente por adición de sales inorgánicas de metales alcalinos o alcalinotérreos o sus mezclas, de manera muy preferida de sales inorgánicas de metales alcalinos, en particular de cloruro de sodio.
- 60 El valor máximo del pH del tampón de equilibrado se selecciona con el fin de evitar cualquier desnaturalización de los productos considerados, a saber aproximadamente 10.
- Ventajosamente, el pH se sitúa en el intervalo de valores superiores a 7 hasta 9, preferentemente de 7,5 a 8,2.
- 65 A título de ejemplo, este tampón está compuesto de cloruro de sodio, a un pH de 7,9-8,1, cuya concentración es de 0,06 M, y puede muy preferiblemente comprender además citrato trisódico, a una concentración preferida de 0,011 M. Se puede utilizar cualquier otro tampón, a base de cloruro de sodio o de sales inorgánicas de metales alcalinos o alcalinotérreos, que comprenda otros compuestos biológicamente compatibles y no desnaturalizantes para los productos de interés.

Cuando la fracción plasmática soluble se ha aplicado sobre el intercambiador de aniones, las condiciones de realización son tales que el pegamento biológico se retiene sobre el soporte.

5 En un modo de realización preferido, el procedimiento de la invención puede comprender, previamente a la etapa de elución del pegamento biológico, una etapa de lavado, con dicho tampón de equilibrado, del intercambiador de aniones hasta la eliminación de las proteínas y de los contaminantes no retenidos. Esta etapa de lavado permite, por percolación del tampón de lavado sobre el soporte, el paso en el filtrado de las proteínas presentes en la solución que contiene fibrinógeno, tales como las inmunoglobulinas G (IgG), A (IgA) y M (IgM) y la albúmina, y unos  
10 contaminantes no retenidos o débilmente retenidos por el intercambiador, como los agentes químicos de inactivación viral. La duración del lavado se determina por medición de la densidad óptica (DO) del filtrado a la longitud de onda de 280 nm. En efecto, un valor de DO que corresponde al de la línea de base es una buena indicación de la eliminación efectiva de los compuestos citados anteriormente.

15 En un modo de realización preferido, el tampón de lavado utilizado corresponde al tampón de equilibrado de la columna y está preferiblemente constituido de cloruro de sodio 0,02-0,1 M y de citrato sódico 0,005-0,02 M, a pH 7,8-8,2.

20 Después del retorno a la línea de base, la elución del pegamento biológico se efectúa por aumento de la fuerza iónica del tampón de equilibrado o de lavado, cuyo pH está preferentemente fijado a 7,4-7,6. El valor de esta fuerza iónica se selecciona con el fin de obtener la elución eficaz del pegamento biológico garantizando al mismo tiempo que este valor no altere las propiedades del producto considerado.

25 Ventajosamente, el valor de la fuerza iónica del tampón de elución está comprendido entre 0,5 y 1,3, en particular entre 0,9 y 1,1. Este aumento de la fuerza iónica se efectúa por adición de cualquier sal o mezcla de sales definidas anteriormente, en particular cloruro de sodio. El tampón de elución puede además contener otros excipientes, tal como una mezcla de constituyentes, denominada mezcla A, que comprende el citrato trisódico (10 a 12 g/l), la lisina (1 a 5 g/l), la glicina (1 a 5 g/l), la sal tris (2 a 5 g/l), la arginina (25 a 50 g/l), y la isoleucina (5 a 15 g/l).

30 La concentración de proteínas en el eluato es generalmente del orden de 4 g/l.

Al menos una parte de la cantidad recogida del eluato de pegamento biológico puede después ser sometida a un tratamiento destinado a separar el FXIII que acompaña al fibrinógeno.

35 Esta separación se realiza haciendo precipitar el FXIII por adición en el eluato de la etapa h) de un agente químico de precipitación, que puede presentarse en forma de una solución acuosa, a una concentración apropiada para obtener la precipitación del factor XIII.

40 De manera preferida, el agente químico precipitante es una solución acuosa a base de sales de citrato 1 M, tales como el citrato de sodio y, en particular, el citrato trisódico.

El precipitado de FXIII formado se separa después del sobrenadante muy enriquecido en fibrinógeno.

45 En un modo de realización preferido, el precipitado de FXIII se puede recuperar por filtración sobre unos filtros de 5 µm.

50 El precipitado de FXIII así recuperado se vuelve a poner en solución, preferentemente en agua o un tampón. En un modo de realización preferido, el precipitado de FXIII se disuelve en un tampón que comprende una mezcla de 10 a 12 g/l de citrato trisódico, de 1 a 5 g/l de lisina, de 1 a 5 g/l de glicina, de 2 a 5 g/l de Tris, de 25 a 50 g/l de arginina y de 5 a 15 g/l de isoleucina, ajustado a un pH comprendido entre 6,9 y 7,1, de manera que la concentración en Factor XIII corresponda a una actividad aproximadamente 100 veces superior a la del plasma normal.

55 A este respecto, el precipitado de FXIII puede, por ejemplo, ser recogido de manera que su concentración sea de aproximadamente 1 a 5 g de proteínas totales/l.

60 Según la invención, las soluciones de pegamento biológico (es decir el eluato de pegamento biológico que resulta de la etapa h)) y de fibrinógeno (sobrenadante enriquecido en fibrinógeno) pueden ser ventajosamente concentradas por ultrafiltración, hasta contenidos típicamente comprendidos entre 15 y 25 g de proteínas totales/l, determinadas por mediciones clásicas conocidas por el experto en la materia.

Las tres soluciones de fibrinógeno, de Factor XIII y de pegamento biológico obtenidas, eventualmente concentradas, son después sometidas a una etapa de diafiltración.

65 La etapa de diafiltración permite eliminar el exceso eventual, por un lado, de sal inorgánica utilizada para obtener unas soluciones que tienen una fuerza iónica de como máximo 0,2 M y, por otro lado, de agente precipitante presente en el precipitado vuelto a poner en solución. Cabe señalar que una presencia importante de sal inorgánica,

necesaria para la elución del pegamento biológico, podría tener una influencia nefasta sobre la eficacia del proceso de liofilización y de la inactivación viral por calentamiento térmico en seco, así como sobre la capacidad de retención de los virus por un nanofiltro apropiado.

5 La etapa de diafiltración puede también ser utilizada para incorporar unos excipientes adecuados, tales como unos estabilizantes y/o unos protectores, destinados a permitir, por un lado, un calentamiento en seco del fibrinógeno, del FXIII y de pegamento biológico sin riesgo de desnaturalización y, por otro lado, una solubilización rápida de los liofilizados, típicamente de 3 a 8 minutos.

10 En un modo de realización preferido, el tampón de diafiltración contiene la mezcla A (que comprende una mezcla de 10 a 12 g/l de citrato trisódico, de 1 a 5 g/l de lisina, de 1 a 5 g/l de glicina, de 2 a 5 g/l de Tris, de 25 a 50 g/l de arginina y de 5 a 15 g/l de isoleucina), y está a pH 6,9-7,1.

15 Ventajosamente, el tampón de diafiltración que comprende la mezcla A es el mismo que el utilizado para eluir el pegamento biológico de la resina de intercambio de aniones. En este modo de realización preferido, la puesta en práctica de la diafiltración y del procedimiento de la invención se encuentra, por lo tanto, simplificada y optimizada.

También pueden ser utilizados unos tampones de diafiltración de composición diferente, en función de las necesidades, con la condición de que cumplan los criterios enunciados anteriormente. La etapa de ultrafiltración mencionada anteriormente puede también ser realizada en las mismas condiciones en esta fase del procedimiento.

20 Las soluciones diafiltradas, eventualmente concentradas por ultrafiltración, son liofilizadas según unos métodos clásicos y condiciones habituales, a saber entre -40°C y -30°C durante aproximadamente 48 horas.

25 En un modo de realización preferido, el procedimiento de la invención comprende al menos una etapa de tratamiento de inactivación viral y/o de eliminación de virus y unos contaminantes tales como, por ejemplo, el príon. Este tratamiento se puede seleccionar del grupo constituido por el tratamiento químico de inactivación viral; la nanofiltración y el tratamiento térmico de inactivación viral en seco.

30 Cuando el tratamiento de inactivación viral es un tratamiento químico, corresponde ventajosamente a un tratamiento por disolvente-detergente, según el método descrito en la patente EP 0 131 740. Los agentes químicos de inactivación viral utilizados corresponden preferiblemente a una mezcla de Tween-TnBP, y de manera más preferida a una mezcla de Tritón (octoxinol)-TnBP, cuyas concentraciones típicas son respectivamente del 0,3% (v/v) y del 1% (p/v). La inactivación viral por tratamiento químico puede estar integrada en una fase cualquiera del procedimiento, pero se lleva a cabo juiciosamente antes de la etapa h) de purificación cromatográfica. De esta manera, la purificación cromatográfica contribuirá a la eliminación eficaz de los agentes de inactivación.

35 En un modo preferido de realización del procedimiento, se puede prever asimismo una etapa de nanofiltración para eliminar los virus, en particular no revestidos, y otros contaminantes exógenos, pudiendo dicha etapa ser utilizada en complemento de la etapa de tratamiento químico de inactivación viral descrita anteriormente. La nanofiltración puede ser realizada ventajosamente sobre unos filtros de una porosidad de 35 nm y/o de 15 nm, aunque se pueden utilizar otros filtros nanométricos en la medida en la que las duraciones de filtración y la eficacia de retención viral están optimizadas.

40 La nanofiltración se lleva a cabo ventajosamente o bien en el eluato que resulta de la etapa h), o bien, llegado el caso, en las soluciones diafiltradas de fibrinógeno, de pegamento biológico y/o de FXIII vuelto a poner en solución, antes de la liofilización de estas últimas.

45 Conviene señalar que la técnica de nanofiltración requiere, para una aplicación eficaz, controlar los parámetros fisicoquímicos que influyen en el rendimiento de recuperación de los compuestos a filtrar, y esto evitando la obstrucción del filtro y el paso de diversos virus y contaminantes. Estos parámetros, tales como la fuerza iónica, el pH de la solución, así como las condiciones de realización de la filtración, imponen unas condiciones específicas de realización que dependen también de la naturaleza del o de los compuestos presentes en la solución a filtrar.

50 La elección juiciosa de los parámetros químicos de la purificación cromatográfica y de los de diafiltración permite por lo tanto realizar la nanofiltración sin alterar sus rendimientos.

55 Finalmente, un tratamiento térmico de inactivación viral en seco se lleva a cabo ventajosamente en los liofilizados de fibrinógeno, de pegamento biológico y de FXIII obtenidos después de la etapa de liofilización, según unas condiciones clásicas a 80°C durante 72 horas, para inactivar unos virus no recubiertos que no habrían sido inactivados y/o eliminados por al menos una de las dos etapas de inactivación viral y/o de eliminación de los virus descritas anteriormente.

60 Los liofilizados calentados en seco pueden después ser reconstruidos en un medio acuoso compatible con un uso clínico, preferentemente en agua purificada para inyección (PPI) y directamente inyectados por vía intravenosa.

65



Así, la puesta en práctica del procedimiento conduce a liofilizados de concentrados de pegamento biológico y de fibrinógeno altamente purificados, cuyo contenido respectivo en fibrinógeno, con respecto al contenido total de proteínas, es de aproximadamente del 85 al 90%.

- 5 Sin la utilización del dispersor en línea, el contenido en fibrinógeno, con respecto al contenido total de proteínas está comprendido entre el 70 y el 77% (véase la tabla A).

Además, las actividades de Factor XIII en los concentrados de pegamento biológico y de fibrinógeno son, respectivamente, de aproximadamente 5 U/ml y de aproximadamente 1,5 U/ml.

- 10 El concentrado de Factor XIII obtenido está desprovisto de proteínas contaminantes y presenta una actividad, según las necesidades, situada en el intervalo de valores que va de aproximadamente 30 U/ml a aproximadamente 700 U/ml, preferentemente de 100 U/ml a 400 U/ml, obtenida en función de la concentración de recolocación en solución del precipitado de FXIII y/o de la obtenida después de la ultrafiltración.

- 15 Además, la presencia de al menos una etapa de tratamiento de inactivación viral y/o de eliminación de los virus y de contaminantes en el procedimiento de la invención hace los concentrados de pegamento biológico, de fibrinógeno y de factor XIII susceptibles de ser obtenidos por este procedimiento apropiado para un uso terapéutico.

- 20 El ejemplo siguiente ilustra un modo de realización de la presente invención, sin limitar, sin embargo, su alcance.

Ejemplo

- 25 Se utilizan 1200 l de plasma humano desprovisto de crioprecipitado. Este plasma se somete a una precipitación etanólica por el método de Cohn, según unas condiciones conocidas por el experto en la materia, de tal manera que la concentración de etanol en el plasma considerado sea del 8% (v/v) y la temperatura de la mezcla así obtenida sea de -3°C a -5°C.

- 30 El sobrenadante y el precipitado así obtenidos son después centrifugados. Se obtienen entre 8 y 12 kg de precipitado etanólico, que constituye la fracción I de Cohn impura.

- 35 La fracción I de Cohn impura se resuspende y se lava mediante 300 l de tampón "Blombach" (Blombäck B, Blombäck M: Purification of human and bovine fibrinogen. Ark Kem 10:415-443, 1956) constituido de una mezcla de glicina 1 M, de citrato trisódico 0,055 M y de etanol 6,5% (v/v), a un pH de 6,8.

El lavado se realiza mediante un sistema de dispersión en línea de tipo Z66 (Ystral).

- 40 Después de la centrifugación sobre una centrifugadora Sharpless AS 16, con unos inyectores calibrados a 3 mm, se recuperan aproximadamente 8 kg de pasta plasmática lavada (fracción I de Cohn purificada) que son disueltos a una temperatura de 37°C, en 60 l de tampón constituido de una mezcla de cloruro de sodio 0,12 M, de citratotrisódico 0,010 M y de arginina 0,05 M, de pH 7,4.

- 45 La pasta plasmática solubilizada así obtenida se somete después a un tratamiento por tratamiento con gel de alúmina, a razón de 108 g para 1 kg de pasta plasmática, a una temperatura de 25°C y a un pH de 6,9-7,1.

- Una vez efectuado el tratamiento con gel de alúmina, la solución se somete a filtraciones lenticulares de profundidad, por medio de filtros de fibras de celulosa (Seitz, type K700) de 0,65 micrones m y esterilizantes por unos filtros de 0,2 µm.

- 50 Esta solución se somete después a un primer tratamiento de inactivación viral por disolvente-detergente en presencia de Tween-TnBP, de concentraciones respectivas del 0,3% (v/v) y 1% (p/v), según el método descrito en el documento EP 0 131 740.

- 55 La tabla A compara la concentración de fibrinógeno, de proteínas y el grado de pureza del fibrinógeno obtenido durante la realización de un procedimiento que comprende una etapa de lavado por dispersión en línea (tal como la descrita anteriormente), con los de un procedimiento similar en el que la etapa de lavado se realiza en ausencia de un sistema de dispersión en línea. Conviene señalar que los resultados presentados en la tabla A corresponden a medias de valores obtenidos respectivamente a partir de 2 lotes de plasma diferentes para el procedimiento que no comprende etapa de lavado por dispersión, y de 3 lotes de plasmas diferentes para el procedimiento que comprende una etapa de lavado por dispersión. Con la excepción de la utilización de un dispersor en línea de tipo rotor/estator durante el lavado del precipitado etanólico, los procedimientos descritos en la tabla A son estrictamente comparables (incluso para el conjunto de los tampones y temperaturas utilizados).
- 60

Tabla A – Resultado de controles en curso de producción

		Procedimiento que no comprende etapa de lavado por dispersión	Procedimiento que comprende una etapa de lavado por dispersión en línea
		Media de 2 lotes	Media de 3 lotes
Materia prima plasmática antes de la precipitación etanólica	Volumen (l)	796	778
	Proteínas (g/l)	56	54,83
	Fibrinógeno coagulable (g/l)	1,55	1,46
	Pureza Fibrinógeno (%)	2,76	2,66
Pasta plasmática solubilizada	Volumen (l)	53	54,33
	Proteínas (g/l)	21,25	17,83
	Fibrinógeno coagulable (g/l)	15,15	15,9
	Pureza Fibrinógeno (%)	71,29	89,17
Sobrenadante obtenido después del tratamiento de la pasta plasmática solubilizada por el hidróxido de aluminio	Volumen (l)	55	54
	Proteínas (g/l)	16,5	15,16
	Fibrinógeno coagulable (g/l)	11,85	12,96
	Pureza Fibrinógeno (%)	71,81	85,13
Fracción plasmática soluble después de la filtración clarificante y esterilizante	Volumen (l)	53,45	53,3
	Proteínas (g/l)	16	14,33
	Fibrinógeno coagulable (g/l)	12,35	12,53
	Pureza Fibrinógeno (%)	77,18	87,43

5 Se demuestra claramente que los resultados obtenidos con el dispersor en línea son significativamente superiores, en la medida en la que el grado de pureza del fibrinógeno es siempre significativamente más elevado que el obtenido con el procedimiento que utiliza un sistema de lavado clásico. Se demuestra por lo tanto que la eficacia del dispersor en línea utilizado, ha contribuido a la mejora de la etapa de lavado y, en consecuencia, al aumento de la pureza del fibrinógeno en esta fase del procedimiento. El dispersor en línea permite así obtener una solución más homogénea, con una dispersión muy fina del precipitado etanólico en el tampón de lavado, y contribuye así a la eliminación de una proporción más elevada de contaminantes. Además, es importante señalar que el control visual de la solución no pone en evidencia aglomerados susceptibles de obstruir los inyectores de las centrifugadoras en las etapas siguientes a la etapa de lavado.

10 Por otro lado, las concentraciones de diferentes proteínas contaminantes se han medido en la fracción plasmática soluble resultante de esta primera parte del procedimiento. Estos resultados se resumen en la tabla B siguiente:

Tabla B:

		Procedimiento que no comprende etapa de lavado por dispersión	Procedimiento que comprende una etapa de lavado por dispersión en línea
		Media de 2 lotes	Media de 3 lotes
Proteínas totales	g/l	16,00	14,33
Proteínas co-purificadas			
Fibronectina	mg/l	746,75	607,8
IgG	mg/l	837,25	325,5
IgA	mg/l	92,35	83,81
IgM	mg/l	257,75	114,9
C3c	g/l	0,13	0,06

C4	g/l	0,155	0,036
Plasminógeno	µg/l	69,68	53,25
FII	µU/l	743,8	578,1
<b>Proteínas co-purificadas</b>	<b>g/l</b>	<b>2,362</b>	<b>1,289</b>
<b>Proteínas co-purificadas</b>	<b>%</b>	<b>14,76</b>	<b>8,99</b>

Destaca claramente de los resultados presentados en la tabla B que la etapa de lavado por dispersión en línea permiten eliminar un número significativamente más elevado de proteínas co-purificadas (proteínas contaminantes) que acompañan al fibrinógeno.

5 La fracción plasmática soluble diluida se inyecta después en una columna cromatográfica rellena de un gel intercambiador de aniones DEAE Macrorep (Bio-Rad-Francia), previamente equilibrada en tampón constituido de cloruro de sodio 0,06 M y de citrato trisódico 0,011 M, ajustado a un pH de 8,0 M, de osmolaridad de 130-150 mosmolkg<sup>-1</sup>. En estas condiciones, el fibrinógeno y el factor XIII, que constituyen el pegamento biológico, son retenidos por el soporte. Las proteínas débilmente retenidas o no retenidas por el soporte son eliminadas en el filtrado, así como los Tween y TnBP, por varios lavados sucesivos con el mismo tampón.

10 Cuando la DO, medida a 280 nm, ha vuelto a caer al valor del de la línea de base, la elución del fibrinógeno y del Factor XIII, que constituyen el pegamento biológico, se efectúa por un tampón de elución que contiene cloruro de sodio 1 M y una mezcla A' constituida de citrato trisódico (11, g/l), de lisina (2,0 g/l), de glicina (2,0 g/l), la sal tris (2,40 g/l), de arginina (40 g/l) y de isoleucina (10 g/l), ajustado a un pH de 7,5, de osmolaridad > 2000 mosmolkg<sup>-1</sup>.

15 El eluato de pegamento biológico purificado así recuperado se somete a una nanofiltración sobre unos filtros PLANOVA (Asahi – Japón) de 35 mm y de 1 m<sup>2</sup> de superficie, a fin de eliminar los virus que no habrían sido inactivados por el tratamiento con disolvente-detergente anterior. El contenido en proteínas totales en esta fase el procedimiento es de aproximadamente 4,0 g/l de solución.

20 Se aísla el 50% del volumen del eluato de pegamento biológico y se añade una solución de citrato trisódico 1 M al resto del volumen de eluato, para hacer precipitar el Factor XIII. Después de asegurarse que todo el Factor XIII ha precipitado, éste se aísla y se recupera por filtración sobre unos filtros Sartopure (Sartorius – Francia) de 5 µm.

25 El precipitado de FXIII así recuperado se vuelve a poner en solución en agua purificada para inyección, a razón de aproximadamente 1 g/l.

30 Las soluciones de pegamento biológico (eluato) y de fibrinógeno, son concentradas por ultrafiltración sobre unos filtros Biomax Millipore 100 kDa de 5 m<sup>2</sup> de superficie, de manera que el contenido en proteínas de cada una de las soluciones alcance 15 g/l.

35 Las soluciones concentradas anteriores y la solución de FXIII son sometidas a una diafiltración sobre los mismos filtros que los utilizados para la ultrafiltración contra la mezcla A' definida anteriormente, de pH 6,9-7,1, de osmolaridad de 590-610 mosmolkg<sup>-1</sup>, lo que permite también la eliminación del cloruro de sodio.

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

45 Los liofilizados de fibrinógeno, de pegamento biológico y de Factor XIII obtenidos se someten a una última etapa de inactivación viral por calentamiento en seco a 80°C durante 72 horas y almacenados para una utilización terapéutica ulterior.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de tratamiento del plasma sanguíneo que comprende las etapas de:
- 5 a) precipitación etanólica del plasma o de una fracción de plasma;
- b) recuperación del precipitado formado en la etapa a);
- 10 c) lavado de dicho precipitado por dispersión que se realiza utilizando un dispersor de tipo rotor/estator;
- d) recuperación de una pasta plasmática lavada; y
- e) solubilización de dicha pasta plasmática lavada.
- 15 2. Procedimiento de tratamiento del plasma sanguíneo según la reivindicación 1, en el que el lavado por dispersión de la etapa c) se realiza utilizando un dispersor en línea, siendo el precipitado de la etapa b) alimentado en la entrada axial del dispersor y siendo el producto lavado expulsado en la salida radial del dispersor.
- 20 3. Procedimiento de tratamiento del plasma sanguíneo según la reivindicación 1 o 2, en el que la recuperación del precipitado en la etapa b) y/o la recuperación de la pasta plasmática en la etapa d) se efectúan por centrifugación.
4. Procedimiento de tratamiento del plasma sanguíneo según la reivindicación 3, en el que la recuperación de la pasta plasmática en la etapa d) se efectúa por utilización de una centrifugadora de inyección.
- 25 5. Procedimiento de tratamiento del plasma sanguíneo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el producto lavado en la etapa c) es sustancialmente homogéneo.
6. Procedimiento de tratamiento del plasma sanguíneo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las etapas adicionales de:
- 30 f) tratamiento de dicha pasta plasmática solubilizada por hidróxido de aluminio y/o tratamiento de dicha pasta plasmática solubilizada a baja temperatura; y
- 35 g) obtención de una fracción plasmática soluble por filtración clarificante y/o esterilizante del sobrenadante que resulta de la etapa f).
7. Procedimiento de tratamiento del plasma sanguíneo según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el lavado por dispersión de la etapa c) se realiza con un tampón constituido de una mezcla de glicina 0,5-1,5 M, de citrato trisódico 0,01-0,1 M y de etanol 5,0-8,0% (v/v), a un pH de 6,7-6,9.
- 40 8. Procedimiento de tratamiento del plasma sanguíneo que comprende el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 7, y que comprende las etapas adicionales de:
- 45 h) purificación cromatográfica de la fracción plasmática soluble de la etapa g) en una resina de tipo intercambiador de aniones de tipo base débil previamente equilibrado por un tampón de fuerza iónica predeterminada de pH básico, en condiciones que permiten la retención del pegamento biológico, siendo dicho pegamento biológico eluido por aumento de la fuerza iónica de dicho tampón;
- 50 i) precipitación de FXIII a partir de todo o parte del eluato de pegamento biológico obtenido en la etapa h) por adición de por lo menos un agente químico que precipita el FXIII;
- j) recuperación de una solución de fibrinógeno purificado que corresponde al sobrenadante de la etapa i); y
- 55 k) diafiltración de las soluciones de fibrinógeno, y/o de pegamento biológico y/o de FXIII vuelto a poner en solución, seguida de una liofilización de dichas soluciones.
- 60 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que comprende al menos una etapa de tratamiento de inactivación viral y/o de eliminación de virus y de contaminantes, siendo el tratamiento seleccionado del grupo constituido por el tratamiento químico de inactivación viral, la nanofiltración y el tratamiento térmico de inactivación viral en seco.
- 65 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, caracterizado por que comprende una etapa de ultrafiltración de concentración efectuada previamente a la etapa de diafiltración k) o posteriormente a dicha etapa, antes de la liofilización.

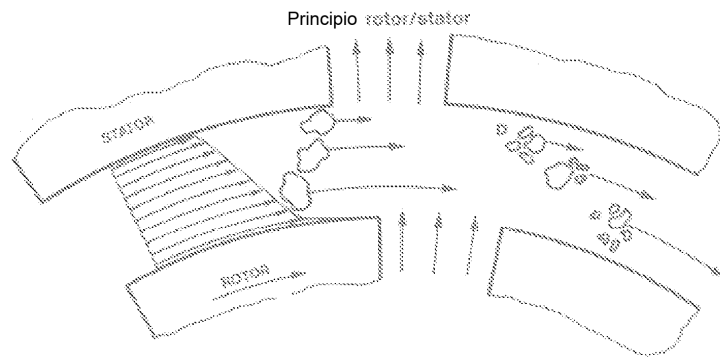


Figura 1