

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 245**

51 Int. Cl.:

A61K 35/16 (2015.01)

A61M 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2012 PCT/EP2012/057228**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012 WO12143484**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2012 E 12714726 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 2699248**

54 Título: **Procedimiento de preparación de un producto plasmático deplecionado de uno o varios factores trombogénicos**

30 Prioridad:

20.04.2011 FR 1153438

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

13.07.2017

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:

**OLLIVIER, MONIQUE y
PAOLANTONACCI, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 624 245 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 preparación de un producto plasmático deplecionado de uno o varios factores trombogénicos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un producto plasmático deplecionado de uno o varios factores trombogénicos. La presente invención se refiere también a tales productos plasmáticos obtenidos por dicho procedimiento.

10

Estado de la técnica

15 El plasma humano comprende una gran cantidad de compuestos susceptibles de presentar un interés terapéutico y/o profiláctico tales como, por ejemplo, los factores de la coagulación, las inmunoglobulinas o la albúmina. Por ello, se han desarrollado numerosos procedimientos de purificación de productos plasmáticos, utilizando unas técnicas extremadamente variadas.

20 Entre las técnicas más utilizadas, el fraccionamiento etanólico permite separar de manera selectiva los diferentes constituyentes del plasma, haciendo precipitar estos últimos por la acción combinada del etanol y de una baja temperatura (véase Cohn *et al.*, 1946, J. AM. Chem. Soc. 68, 459). El aumento de unos estándares terapéuticos ha necesitado no obstante la realización de etapas de purificación adicionales que tienen como objetivo eliminar los contaminantes susceptibles de originar unas reacciones anafilácticas o susceptibles de ser deletéreas o patógenas para el organismo del paciente receptor. Entre las técnicas empleadas para efectuar estas etapas de purificación complementaria de los productos plasmáticos, las más utilizadas son las técnicas de precipitación y de separación cromatográficas.

25

Parece así que la utilización de una técnica de precipitación de las proteínas en presencia de ácido caprílico (también denominado ácido octanoido) permite eliminar la mayoría de las proteínas del plasma, con la excepción de las inmunoglobulinas (véase Steinbuch *et al.*, Rev. Franç. Et. Clin. Et Biol. 1969, XIV, 1054).

30

Diversos procedimientos se han desarrollado también para aumentar la pureza de los productos mediante la realización de técnicas cromatográficas. Se pueden citar en particular las solicitudes de patente EP 0 703 922 y WO 99/64462, que describen la asociación de al menos dos etapas sucesivas de cromatografía, una por intercambio de aniones, la otra por intercambio de cationes. La especificidad de estos procedimientos se aporta por la propiedad de los intercambiadores de aniones de no retener las inmunoglobulinas G, en las condiciones clásicas de realización, sino que fijan la mayoría de las otras proteína co-purificadas durante unas etapas de depurificación.

35

40 La solicitud de patente WO 02/092632, depositada por la solicitante, divulga por su parte un procedimiento de preparación de concentrados de inmunoglobulinas humanas a partir del plasma, que comprende una etapa de fraccionamiento etanólico, una etapa de precipitación de los contaminantes lipídicos y proteicos mediante ácido caprílico, fosfato tricálcico o bentonita, y una separación cromatográfica sobre intercambiador de aniones a pH alcalino, durante la cual las inmunoglobulinas se adsorben sobre el soporte cromatográfico. El procedimiento descrito en la solicitud WO 02/092632 puede también comprender una etapa de inactivación viral, así como una etapa de concentración, de filtración y de liofilización del concentrado de inmunoglobulina obtenido.

45

50 La solicitud WO 2007/077365, depositada por la solicitante, describe también un procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulina G deplecionado de anticuerpos anti-A y anti-B que comprende una etapa de cromatografía de afinidad efectuada sobre un soporte que presenta unos oligosacáridos antigénicamente similares a los grupos sanguíneos A y B, y que comprenden una etapa de eliminación viral por filtración. Los concentrados de IgG obtenidos por el procedimiento descrito en la solicitud WO 2007/077365 presentan un contenido en anticuerpos anti-A y anti-B conforme a un resultado negativo al ensayo de Coombs indirecto *in vivo* y una baja polirreactividad generada por el procedimiento de fabricación, reduciendo así los riesgos de hemólisis y de efectos indeseables que resultan de estos anticuerpos o de esta polirreactividad.

55

El documento US5164487 describe también un procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas G obtenido a partir del plasma gracias a un procedimiento que comprende una etapa de fraccionamiento con etanol, una etapa de precipitación con ácido caprílico; y una etapa de cromatografía sobre resina intercambiadora de iones.

60

El documento EP0512883 describe también un procedimiento de obtención de un concentrado de factor XI por filtración-adsorción sobre un filtro de celulosa-perlita cargado negativamente, después una purificación por cromatografía sobre resina intercambiadora de iones.

65

La presente invención tiene por objeto los productos plasmáticos tales como las inmunoglobulinas específicas, las inmunoglobulinas polivalentes, las enzimas, las proteínas de la anestesia y de la reanimación por ejemplo la albúmina, el fibrinógeno o la antitrombina.

5 Los productos plasmáticos purificados conocidos siguen siendo susceptibles de generar unos efectos indeseables en los pacientes, durante su administración terapéutica, en particular debido al hecho de que no pueden a priori ser considerados como totalmente desprovistos de factores trombogénicos. La presencia de estos factores trombogénicos FXII, FX, FIX, FVII, FVIII y/o FXI y de sus formas activadas es susceptible de conducir a la formación de trombosis cuando el producto plasmático en cuestión es administrado a los pacientes, y podría en los casos extremos provocar la muerte de estos pacientes. Los procedimientos conocidos en el estado de la técnica no divulgan específicamente ningún método para eliminar de manera satisfactoria estos factores trombogénicos, en la medida en las que las propiedades físico-químicas de éstos y de sus formas activadas, pueden ser extremadamente similares de las de los productos plasmáticos que presentan un interés terapéutico, tales como las inmunoglobulinas por ejemplo.

15 Existe por lo tanto una alta necesidad de un procedimiento de purificación que permita preparar unos productos plasmáticos a partir de plasma humano, en los que la cantidad final de factores trombogénicos, tales como los factores FXI, FXII, FX, FIX, FVII y/o FVIII, y en particular de FXI, así como sus versiones activadas, sea nula o tan baja que no presente ningún riesgo para la salud de los pacientes tratados con el producto plasmático purificado.

Resumen de la invención

20 La solicitante ha desarrollado así un procedimiento que permite ventajosamente preparar un producto plasmático deplecionado de uno o varios factores trombogénicos.

25 Por factores trombogénicos, se entienden unos factores susceptibles de conducir a la formación de trombosis cuando están presentes de manera contaminante en un producto plasmático. Los factores trombogénicos pueden en particular ser unos factores de coagulación. En particular los factores FVII, FVIII, FIX, FX, FXI y FXII y sus formas activadas son unos factores trombogénicos.

30 En un modo de realización preferido, el producto plasmático obtenido por el procedimiento de la invención está deplecionado de uno o varios factores trombogénicos. En particular, el producto plasmático está deplecionado de FVII, FVIII, FIX, FX, FXI y/o FXII y sus formas activadas. En particular, el producto plasmático obtenido por el procedimiento de la invención está deplecionado de FVII, FX, FXII y FXI y sus formas activadas. De manera más particular, está deplecionado de FVII y su forma activada FVIIa. De manera más particular, está deplecionado de FX y su forma activada FXa. De manera más particular, está deplecionado de FXI y su forma activada FXIa. De manera más particular, está deplecionado de FXII y su forma activada FXIIa.

35 La presente invención describe que la realización de una combinación de al menos dos etapas seleccionadas entre un fraccionamiento etanólico, una adsorción-filtración sobre un filtro de filtración en profundidad, una precipitación con ácido caprílico y una cromatografía sobre resina intercambiadora de iones, permite ventajosamente deplecionar el producto plasmático de uno o varios factores trombogénicos y sus formas activadas.

40 La presente invención describe también un procedimiento de preparación de un producto plasmático deplecionado de factores trombogénicos, que comprende la combinación de al menos dos etapas, preferentemente al menos tres etapas, seleccionadas entre:

- 45 - una etapa de fraccionamiento con etanol;
- una etapa de filtración-adsorción;
- una etapa de precipitación con ácido caprílico; y
- 50 - una etapa de cromatografía sobre resina intercambiadora de iones.

La presente solicitud describe un procedimiento de preparación de un producto plasmático deplecionado de factores trombogénicos que comprende las etapas sucesivas que consisten en:

- 55 - una etapa de fraccionamiento con etanol; y
- una etapa de filtración-adsorción.

60 La presente invención describe un procedimiento de preparación de un producto plasmático deplecionado de factores trombogénicos que comprende las etapas sucesivas que consisten en:

- una etapa de fraccionamiento con etanol; y
- 65 - una etapa de precipitación con ácido caprílico.

La presente invención describe un procedimiento de un producto plasmático deplecionado de factores trombogénicos que comprende las etapas sucesivas que consisten en:

- 5
- una etapa de fraccionamiento con etanol; y
 - una etapa de cromatografía sobre resina intercambiadora de iones.

La presente invención describe un procedimiento de un producto plasmático deplecionado de factores trombogénicos que comprende las etapas sucesivas que consisten en:

- 10
- una etapa de filtración-adsorción; y
 - una etapa de fraccionamiento con etanol

15 La presente solicitud describe un procedimiento de preparación de un producto deplecionado de factores trombogénicos que comprende las etapas sucesivas que consisten en:

- una etapa de filtración-adsorción; y
- 20 - una etapa de precipitación con ácido caprílico.

La presente solicitud describe un procedimiento de preparación de un producto deplecionado de factores trombogénicos que comprende las etapas sucesivas que consisten en:

- 25
- una etapa de filtración-adsorción; y
 - una etapa de cromatografía sobre resina intercambiadora de iones.

La presente solicitud describe un procedimiento de preparación de un producto deplecionado de factores trombogénicos que comprende las etapas sucesivas que consisten en:

- 30
- una etapa de precipitación con ácido caprílico; y
 - una etapa de cromatografía sobre resina intercambiadora de iones.

35 La presente solicitud describe un procedimiento de preparación de un producto deplecionado de factores trombogénicos que comprende las etapas sucesivas que consisten en:

- 40
- una etapa de fraccionamiento con etanol;
 - una etapa de filtración-adsorción; y
 - una etapa de precipitación con ácido caprílico.

45 La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un producto deplecionado de factores trombogénicos que comprende las etapas sucesivas que consisten en:

- una etapa de filtración-adsorción;
- 50 - una etapa de fraccionamiento con etanol; y
- una etapa de precipitación con ácido caprílico.

En un modo de realización particular, el procedimiento de preparación de un producto deplecionado de factores trombogénicos de la invención comprende las etapas sucesivas que consisten en:

- 55
- una etapa de fraccionamiento con etanol;
 - una etapa de precipitación con ácido caprílico; y
 - 60 - una etapa de cromatografía sobre resina intercambiadora de iones.

En un modo de realización particular, el procedimiento de preparación de un producto deplecionado de factores trombogénicos de la invención comprende las etapas sucesivas que consisten en:

- 65
- una etapa de fraccionamiento con etanol;

- una etapa de filtración-adsorción; y
- una etapa de cromatografía sobre resina intercambiadora de iones.

5 De manera ventajosa, el procedimiento de preparación de la presente invención comprende además una o varias etapas de cromatografía, preferentemente una o varias cromatografías sobre resina intercambiadora de iones.

10 En un modo de realización particular, el procedimiento de preparación de un producto plasmático deplecionado de factores trombogénicos de la invención comprende las etapas sucesivas que consisten en:

- una etapa de filtración-adsorción;
- una etapa de precipitación con ácido caprílico; y
- una etapa de cromatografía sobre resina intercambiadora de iones.

15 En un modo de realización particular, el procedimiento de preparación de un producto plasmático deplecionado de factores trombogénicos de la invención comprende las etapas sucesivas que consisten en:

- una etapa de fraccionamiento con etanol;
- una etapa de filtración-adsorción;
- una etapa de precipitación con ácido caprílico; y
- una etapa de cromatografía sobre resina intercambiadora de iones;

o que consiste en:

- una etapa de filtración-adsorción;
- una etapa de fraccionamiento con etanol;
- una etapa de precipitación con ácido caprílico; y
- una etapa de cromatografía sobre resina intercambiadora de iones.

40 En un modo de realización particular, la etapa de filtración-adsorción se efectúa sobre un filtro de filtración en profundidad que comprende celulosa y perlitas, así como una resina cargada. De manera preferida, el filtro utilizado para la etapa de filtración-adsorción posee un grado que va de 0,1 a 0,4 μm , preferentemente de 0,2 a 0,4 μm , preferentemente de 0,25 a 0,35 μm , preferentemente de 0,3 μm .

45 En un modo de realización particular, el procedimiento de preparación de la presente invención comprende una o dos etapas adicionales seleccionadas entre las etapas de inactivación viral, preferentemente por disolvente-detergente, y de eliminación viral, preferentemente por nanofiltración.

50 En un modo de realización particular, el procedimiento de preparación de la presente invención comprende una o dos etapas adicionales seleccionadas entre las etapas de inactivación viral, preferentemente por disolvente-detergente, y de cromatografía de afinidad sobre un soporte que comprende unos oligosacáridos antigénicamente similares a los grupos sanguíneos A y B.

55 En un modo de realización particular, el procedimiento de preparación de la presente invención comprende una etapa final de concentración, filtración y adición de un estabilizante farmacéuticamente aceptable, después de acondicionamiento al estado de solución estéril eventualmente de congelación y de liofilización.

Otras características y ventajas de la invención aparecerán a partir de la lectura de la descripción siguiente de un modo de realización preferido de la invención, dado a título de ejemplo.

60 Descripción detallada de modos de realización de la invención

65 En la presente invención, por "producto plasmático", se entiende cualquier compuesto, cualquier proteína, tal como una inmunoglobulina o la albúmina, el fibrinógeno o la antitrombina, o cualquier mezcla de proteínas, susceptibles de ser purificadas a partir del plasma humano. Por ejemplo, el producto puede ser las inmunoglobulinas específicas, las inmunoglobulinas polivalentes, las enzimas, las proteínas de la anestesia y de la reanimación tales como la albúmina, el fibrinógeno o la antitrombina. El producto plasmático de la invención corresponde preferentemente a

una inmunoglobulina G (o IgG), a una inmunoglobulina A (o IgA), a una inmunoglobulina M (o IgM), a una inmunoglobulina E (o IgE), o a una mezcla de una o más de estas últimas, y se presenta preferentemente en forma de una solución o de un concentrado. En un modo de realización particular, el producto plasmático de la invención corresponde a un concentrado de inmunoglobulinas dirigidas específicamente contra un antígeno particular, como por ejemplo unos anticuerpos citotóxicos anti-rhesus o anti-D. En otro modo de realización, el producto plasmático de la invención puede también corresponder a una mezcla de inmunoglobulinas polivalentes, compuestas por el 97% de IgG y dirigidas contra una gran diversidad de antígenos. En otro modo de realización, el producto plasmático de la invención puede además corresponder a albúmina, fibrinógeno, o antitrombina.

Por "productos obtenidos según el procedimiento de la invención" se entiende cualquier producto de tipo producto plasmático obtenido de manera directa o indirecta mediante el procedimiento según la invención, o susceptible de ser obtenido por este procedimiento.

De manera general, cuando se hace referencia a un factor trombogénico, se hace referencia a las formas inactivadas o activadas de estos factores. En efecto, los efectos trombogénicos de estos factores son particularmente pronunciados cuando estos últimos se encuentran en forma activada. El procedimiento de la presente invención permite de manera sorprendente eliminar los factores trombogénicos, en particular cuando se encuentran en su forma activada. En particular, cuando se hace referencia al "factor XI" o "FXI" en la presente solicitud, se entiende por lo tanto el factor XI en su forma inactivada y el factor XI en su forma activada (también designado como FXIa). Este es también el caso para cada uno de los demás factores trombogénicos citados en la presente solicitud.

Por "fracción etanólica" en el sentido de la presente invención, se entienden unas fracciones plasmáticas obtenidas en las diferentes etapas de un fraccionamiento etanólico del plasma, tal como se conoce por el experto en la materia.

En el ámbito de la presente invención, por "deplecionado de factor(es) trombogénico(s)", se entiende que el producto plasmático obtenido según el procedimiento de la invención no contiene más factor(es) trombogénico(s), o contiene únicamente unas trazas no significativas de éste o estos últimos. Resulta que el producto plasmático de la invención no puede por lo tanto provocar en el paciente la formación de trombosis ocasionadas por el inicio de la coagulación en presencia de factor(es) trombogénico(s) contaminantes.

Por "deplecionado de FVII, en FVIII, en FIX, en FX y/o en FXII", se entiende por lo tanto que el producto plasmático obtenido según el procedimiento de la invención ya no contiene FVII, FVIII, FIX, FX y/o FXII, o que contiene únicamente unas trazas residuales de estos últimos. Resulta que el producto plasmático obtenido según el procedimiento de la invención no puede por lo tanto provocar la formación de trombosis ocasionadas por el inicio de la coagulación en presencia de uno cualquiera de los factores FVII, FVIII, FIX, FX y/o FXII.

En un modo de realización preferido, el producto plasmático obtenido según el procedimiento de la invención está deplecionado de FVII y/o deplecionado de FX.

En un modo de realización preferido, el producto plasmático obtenido según el procedimiento de la invención está deplecinado de FXI. Por "producto plasmático deplecionado de FXI" se entiende un producto plasmático, en particular un producto plasmático de tipo inmunoglobulinas polivalentes, que presentan menos de 0,8 mU/mg Ig, preferentemente menos de 0,5 mU/mg Ig en FXI.

En otro modo de realización preferido, el producto plasmático obtenido según el procedimiento de la invención está deplecionado de FXII. Por "producto plasmático deplecionado de FXII" se entiende un producto plasmático, en particular un producto plasmático de tipo inmunoglobulinas polivalentes, que presentan menos de 20 μ U de FXII/mg Ig, preferentemente menos de 10 μ U de FXII/mg Ig.

En un modo de realización particular de la presente invención, el producto plasmático deplecionado de uno o varios factores trombogénicos puede presentarse en forma líquida o liofilizada, y/o acondicionarse en presencia de estabilizantes apropiados. Puede también almacenarse en espera de una utilización posterior. Los estabilizantes añadidos permiten ventajosamente asegurar la estabilidad del producto plasmático a lo largo del tiempo y vuelven posible la liofilización evitando la desnaturalización del producto plasmático durante esta última y durante el almacenamiento. Los estabilizantes utilizados corresponden ventajosamente a los descritos por la solicitante en su solicitud de patente WO 2004/091656, a saber una mezcla de un azúcar alcohólico, de glicina y de un detergente no iónico.

Los productos plasmáticos purificados de la invención están destinados a un uso terapéutico y pueden ser objeto de una administración por vía sistémica, oral, parenteral, intravenosa, intramuscular, per o transcutánea, nasal, rectal, perlingual, ocular o respiratoria. Para eso, los productos plasmáticos deplecionados de uno o varios factores trombogénicos de la invención son viralmente seguros, por ejemplo mediante un tratamiento clásico de inactivación viral (por ejemplo por tratamiento disolvente-detergente) y/o por un tratamiento de eliminación viral (por ejemplo por nanofiltración).

En un modo de realización preferido, cuando el producto plasmático a purificar corresponde a unas inmunoglobulinas, la separación cromatográfica se efectúa sobre una resina de tipo intercambiador de aniones, preferentemente sobre una resina de tipo dietilaminoetilo (DEAE), trimetilaminoetilo (TMAE) o amina cuaternaria (QAE).

En un modo de realización particular de la presente invención, el procedimiento de la invención puede comprender unas etapas de purificación adicionales, tales como unas cromatografías de afinidad o unas cromatografías hidrófobas.

Cuando el producto plasmático purificado de la invención corresponde a unas inmunoglobulinas, el procedimiento de la presente invención comprende una etapa adicional de separación por cromatografía de afinidad sobre un soporte cromatográfico que comprende unos oligosacáridos antigénicamente similares a los grupos sanguíneos A y B. Esta etapa de purificación adicional permite ventajosamente eliminar los anticuerpos anti-A y anti-B del producto plasmático purificado obtenido en la etapa anterior. Esta eliminación se puede efectuar según el método descrito en la solicitud de patente WO 2007/077365.

En un modo de realización particular, el procedimiento de la invención comprende también al menos una etapa de inactivación y/o de eliminación de agentes infecciosos, tales como los virus o los priones. La inactivación viral se realiza preferentemente mediante un tratamiento térmico, o mediante un tratamiento químico tal como un tratamiento de tipo disolvente-detergente. El tratamiento disolvente-detergente se puede realizar utilizando por ejemplo una mezcla de tri-n-butilfosfato (TnBP) y un detergente seleccionado entre el Triton X-100 o el Tween 80. Es asimismo posible proceder a una inactivación viral sometiendo el producto plasmático purificado a una irradiación con UV o con rayos gamma. La eliminación viral se realiza preferiblemente por nanofiltración sobre filtros nanométricos que tienen una porosidad decreciente que va de 100 nm a 15 nm. La etapa de nanofiltración permite ventajosamente eliminar los eventuales patógenos (virus o priones, por ejemplo) que no se hubieran eliminado por el tratamiento disolvente-detergente. La eliminación viral se puede efectuar sobre cualquier filtro apropiado, y preferiblemente sobre unos filtros Planova 35 nm, Planova 20 nm y/o Planova 15 nm. La etapa de nanofiltración puede, llegado el caso, efectuarse después de eventuales etapas de concentración y/o de ultrafiltración del producto plasmático purificado.

En un modo de realización particular, el procedimiento de la presente invención puede también comprender una etapa de concentración y/o de ultrafiltración del producto plasmático purificado. El producto plasmático purificado puede también estar sometido a una etapa de filtración esterilizante y/o a una etapa de congelación y de liofilización. Puede también ser almacenado en espera de una utilización posterior. Los estabilizantes añadidos permiten ventajosamente asegurar la estabilidad del producto plasmático a lo largo del tiempo y vuelven posible la liofilización evitando la desnaturalización del producto plasmático durante esta última y durante el almacenamiento. Los estabilizantes utilizados corresponden ventajosamente a los descritos por la solicitante en su solicitud de patente WO 2004/091656, a saber una mezcla de un azúcar alcohólico, de glicina y de un detergente no iónico.

En un modo de realización preferido, el procedimiento de la presente invención comprende la realización sucesiva:

- de una etapa de filtración-adsorción;
- de una etapa de fraccionamiento con etanol; y
- de una etapa de precipitación con el ácido caprílico.

Estas combinaciones de etapas permiten ventajosamente eliminar los factores trombogénicos presentes en el producto plasmático inicial, y en particular los factores FVII, FVIII, FIX, FX, FXI y/o FXII.

Estas combinaciones de etapas, que presentan una eficacia comparable, permiten más particularmente eliminar el factor FXI, FVII, FX y/o FXII, hasta alcanzar una concentración de factores inferior al límite de detección respectivo.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin por ello limitar su alcance.

Ejemplos

Ejemplo 1: Eliminación de FXI sobre filtro

Las diferentes etapas de filtración se realizan a una temperatura comprendida entre 4°C y 10°C. Los filtros cargados se aclaran previamente con un mínimo de 6 ml de solución tampón de equilibrado (CTS 2,94 g/l, Na₂HPO₄ 1,79 g/l, KH₂PO₄ 0,7 g/l, NaCl 3,5 g/l) por cm² de superficie filtrante aplicando un caudal de 7,5 ml/h/cm². Se filtra un volumen variable de sobrenadante de crioprecipitación. El caudal se midió por pesaje de la fracción filtrada a intervalos de tiempo regulares. El caudal medido después de los 5 primeros minutos de filtración se considera como el caudal inicial. Según los ensayos, el filtro se aclara después de la inyección de la materia prima con un volumen variable de

5 solución tampón de equilibrado que permite estudiar la influencia del aclarado del filtro sobre la retención del factor XI y sobre la recuperación de las proteínas no adsorbidas. A fin de ensayar la eficacia de retención de la filtración-adsorción, se eluye el FXI con la solución tampón de elución. Se han extraído unas muestras sobre las fracciones homogeneizadas de inicio, filtrado y eluado, después se dividieron en alícuotas, se identificaron y se almacenaron a una temperatura inferior o igual a -70°C.

10 Los resultados obtenidos durante unos ensayos de filtración para el filtro ensayado se presentan en la tabla siguiente y demuestran la capacidad de un filtro de filtración en profundidad que comprende celulosa y perlitas, así como una resina cargada, por ejemplo el filtro Sartoclear® P 24 cm², poseyendo dicho filtro un grado que va de 0,1 a 0,4 µm, para retener el FXI.

Filtro ensayado	Carga (ml/cm ²)	Caudal (ml/h/cm ²)	Pérdida de FXI en el filtrado	Rendimiento de retención de FXI (eluato 1M NaCl)	Volumen del filtrado recuperado (ml/cm ²)
Sartoclear® P 24 cm ²	4.2	5	< límite de detección	99%	7,9
Sartoclear® P 24 cm ²	14.6	5	< límite de detección	72%	21,5

Ejemplo 2: Eliminación de FXI por cromatografía

15 Las diferentes etapas de filtración se han realizado a una temperatura comprendida entre 4°C y 10°C.

20 Después de la clarificación por paso sobre Millipak 0,22 µm, el sobrenadante de crioprecipitación se inyectó sobre una columna empaquetada con el gel estudiado equilibrado con la solución de tampón de equilibrado (CTS 2,94 g/l, Na₂HPO₄ 1,79 g/l), KH₂PO₄ 0,7 g/l, NaCl 3,5 g/l). Después, el gel se lava con la misma solución tampón hasta volver a la línea de base.

25 Con el fin de ensayar la eficacia de retención de la cromatografía, se ha eluido después el FXI por paso de solución tampón de elución de fuerza iónica muy elevada sin etapa de prelavado del gel para eliminar las proteínas débilmente fijadas sobre el gel.

Se han extraído unas muestras sobre las fracciones recolectadas y homogeneizadas, se han dividido en alícuotas, identificado y almacenado a una temperatura inferior o igual a -70°C hasta las dosificaciones bioquímicas.

30 Los resultados obtenidos durante unos ensayos de cromatografía, con diferentes columnas de cromatografía, se presentan en la tabla siguiente

Condiciones de ensayo	Carga FXI aplicada (U/ml de gel)	Caudal (ml/h/cm ²)	Pérdida FXI en el filtrado	Rendimiento de retención del FXI
SP Sefarosa «Big Beads» columna K15 empaquetada a 5 cm de altura del gel 7°C eluato 1M	12	150	<21%	92,5%
Streamline SP en lecho fijo, columna K26 (5 cm ²) empaquetada a 1 cm de altura del gel 12°C eluato 1M	40	60	23,6%	78,3%
Streamline SP en lecho fluidizado	63	300	28,1%	70,5%
Columna K26 (2 cm ²) empaquetada a 5,5 cm de altura del gel 5,5°C eluato 1M				

Ejemplo 3

35 A: Fraccionamiento etanólico, precipitación caprítica y cromatografía

40 Se utiliza como material de partida 1 kg de precipitado etanólico "fracción I + fracción II + fracción III", obtenido a partir de plasma según el método de Cohn o de Kistler y Nitschmann (1962, Vox Sang. 7, 414). Este precipitado se resuspende en tampón acetato (acetato de sodio-ácido acético) a pH 4,7-4,9, bajo agitación, a 20°C.

Se añade al precipitado resuspendido ácido caprítico. La adición debe ser efectuada lentamente, a temperatura ambiente. La mezcla se adiciona con un adyuvante de filtración y el precipitado se separa por filtración mediante un filtro-prensa.

45 El filtrado se recupera, se clarifica y se concentra por ultrafiltración, después se somete a una filtración esterilizante a 0,45 µm y 0,2 µm. Se somete después a un tratamiento de inactivación viral por disolvente/detergente, como se describe por Neurath y Horowitz (patente US 4,764,369). Se utiliza una mezcla Triton X100/TnBP.

Se ajusta la mezcla a 64 g/l de proteínas, a pH 6,5. El contacto se mantiene durante 4 a 6 horas, entre 4 y 25°C. Después, el pH se ajusta a 9 con NaOH. La mezcla se somete después a una cromatografía de intercambio de aniones sobre columna. Se utiliza como material intercambiadora de aniones el TMAE Fractogel®, cargado en una columna de cromatografía, equilibrada en tampón glicina-NaCl (glicina 0,676 g/l-NaCl 0,526 g/l) a pH 9. La mezcla se carga sobre la columna a razón de 50 g de proteínas para 1 litro de gel. Después de la carga, la columna se lava en tampón glicina-NaCl, pH 9 (el mismo que para el equilibrado). El lavado se observa por densidad óptica del efluente a 280 nm. Después de volver a la línea de base, la columna se eluye con tampón fosfato a pH 6,2 (hidrogenofosfato disódico-dihidrogenofosfato de sodio). El eluato, que contiene las inmunoglobulinas G, se ajusta a pH 4,5 y se somete a una ultrafiltración sobre casetes.

Después, la solución se somete a una filtración esterilizante a 0,22 µm, después a una filtración nanométrica sobre tres filtros dispuestos en serie y de límites de retención decrecientes, de 100, 50 y 20 nanómetros. La filtración se sigue de una ultrafiltración sobre casete para concentrar la solución final a 120-150 g/l.

B: Comparación de IgIV con respecto a su porcentaje en factor XI y factor XII

Un concentrado de inmunoglobulinas preparado según el procedimiento descrito en el ejemplo 3A se compara con otros concentrados de inmunoglobulinas del mercado.

Un concentrado de IgIV preparado según el protocolo descrito en el ejemplo 3A presenta un porcentaje de factor XI inferior a 0,5 mU/mg Ig mientras que los otros concentrados de inmunoglobulinas del mercado presentan unos porcentajes de factor XI superiores a 0,8 mU/mg Ig con, para algunos, un porcentaje de factor XI superior a 2 mU/mg Ig.

Se ha evaluado también el porcentaje de factor XII. Los concentrados de inmunoglobulinas del mercado presentan un porcentaje de factor XII superior a 20 µU/mg Ig con, para algunos, un porcentaje de factor XII superior a 30 µU/mg Ig, mientras que un concentrado de IgIV preparado según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 presenta un porcentaje de factor XII inferior a 10 µU/mg Ig.

C: Determinación de los factores VII y X antes y después del procedimiento que comprende las etapas de fraccionamiento etanólico, precipitación caprítica y cromatografía

Los contenidos en factores VII y X se miden antes y después del procedimiento, tal como se ha descrito en el ejemplo 3A.

Los contenidos en el plasma (antes del procedimiento que comprende el fraccionamiento etanólico, la precipitación caprítica y la cromatografía) corresponden a las medias de los valores determinadas para seis lotes de plasma de 4500 litros.

Factor		VII	X
Plasma	Volumen (l)	4500	4500
	CC (EUI/ml)	0,66	0,39
	Total (EUI)	2970000	1755000
P1 – después	Volumen (l)	431	431
	CC (mEUI/ml)	(<)3,1	(<)0,7
Fraccionamiento etanólico, precipitación caprítica y cromatografía.	Total (EUI)	1336,1	301,7
Factor de eliminación (P1/Plasma)		2223	5817
Log		(>)3,3	(>)3,8

Cc: concentración- (<): concentración inferior al límite de detección; en este caso, se considera el límite de detección para los cálculos

Después de las etapas de fraccionamiento etanólico, precipitación caprítica y cromatografía, el contenido en FVII antígeno es inferior al límite de detección.

La relación P1/plasma muestra una disminución relacionada con el procedimiento que comprende las etapas de fraccionamiento etanólico, precipitación caprítica y cromatografía superior a 3 logs.

Como para el factor VII, después de las etapas de fraccionamiento etanólico, precipitación caprítica y cromatografía, el contenido en FX antígeno es inferior al límite de detección.

La relación P1/plasma muestra una disminución relacionada con el procedimiento que comprende las etapas de fraccionamiento etanólico, precipitación caprítica y cromatografía de cerca de 4 logs.

El ejemplo 3C muestra bien que un procedimiento que comprende las etapas de fraccionamiento etanólico, precipitación caprónica y cromatografía según la invención permite la obtención de un producto plasmático deplecionado de factores trombogénicos.

5 Ejemplo 4:

A: Filtración, fraccionamiento etanólico y precipitación caprónica

10 Se filtra un sobrenadante de crioprecipitación sobre un filtro de filtración en profundidad que comprende celulosa y perlitas, así como una resina cargada, por ejemplo el filtro Sartoclear® P 24 cm², poseyendo dicho filtro un grado que va de 0,1 a 0,4 µm.

15 El filtrado se somete a un fraccionamiento etanólico según el método de Cohn o de Kistler y Nitschmann (1962, Vox Sang. 7,414). El precipitado etanólico "fracción I + fracción II + fracción III" se resuspende en tampón acetato (acetato de sodio-ácido acético) a pH 4,7-4,9, bajo agitación, a 20°C.

20 Se añade al precipitado resuspendido ácido caprónico. La adición debe ser efectuada lentamente, a temperatura ambiente. La mezcla se adiciona con un adyuvante de filtración y el precipitado se separa por filtración mediante un filtro-prensa.

El filtrado se recupera, clarifica y concentra por ultrafiltración, después se somete a una filtración esterilizante a 0,45 µm y 0,2 µm.

25 B: Determinación de los factores VII y X antes y después del procedimiento que comprende las etapas de filtración, fraccionamiento etanólico y precipitación caprónica.

Los contenidos en factores VII y X se miden antes y después del procedimiento tal como se ha descrito en el ejemplo 4A.

30 Los contenidos antes del procedimiento corresponden a las medias de los valores determinados para seis lotes de plasma de 4500 litros.

Factores		VII	X
Plasma	Volumen (l)	4500	4500
	CC (EUI/ml)	0,85	0,75
	Total (EUI)	3825000	3375000
P1 – después de la filtración, fraccionamiento etanólico y precipitación caprónica.	Volumen (l)	436	436
	CC (mEUI/ml)	(<)3,1	(<)0,7
	Total (EUI)	1351,6	305,2
Factor de eliminación (P1/Plasma)		2830	11058
Log		(>)3,5	(>)4,1

35 *Cc: concentración- (<): concentración inferior al límite de detección; en este caso, se considera el límite de detección para los cálculos*

Después de las etapas de filtración, fraccionamiento etanólico y precipitación caprónica, el contenido en FVII antígeno es inferior al límite de detección.

40 La relación P1/plasma muestra una disminución relacionada con el procedimiento que comprende las etapas de filtración, fraccionamiento etanólico y precipitación caprónica superior a 3 logs.

Como para el factor VII, después de las etapas de fraccionamiento etanólico, precipitación caprónica y cromatografía, el contenido en FX antígeno es inferior al límite de detección.

45 La relación P1/plasma muestra una disminución relacionada con el procedimiento que comprende las etapas de filtración, fraccionamiento etanólico y precipitación caprónica de cerca de 4 logs.

50 El ejemplo 4B muestra bien que un procedimiento que comprende las etapas de filtración, fraccionamiento etanólico y precipitación caprónica según la invención permite la obtención de un producto plasmático deplecionado de factores trombogénicos.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de un producto plasmático deplecionado de uno o varios factores trombogénicos, que comprende las etapas sucesivas que consisten en:
- 5 - una etapa de filtración-adsorción;
- una etapa de fraccionamiento con etanol; y
- 10 - una etapa de precipitación con ácido caprílico.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende una etapa adicional de cromatografía sobre resina intercambiadora de iones.
- 15 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la etapa de filtración-adsorción se efectúa sobre un filtro de filtración en profundidad que comprende celulosa y perlitas, así como una resina cargada, poseyendo dicho filtro un grado que va de 0,1 a 0,4 μm , preferentemente de 0,2 a 0,4 μm , preferentemente de 0,25 a 0,35 μm , preferentemente de 0,3 μm .
- 20 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que comprende una etapa adicional de inactivación viral, preferentemente por disolvente-detergente, y/o una etapa adicional de eliminación viral, preferentemente por nanofiltración.
- 25 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que comprende una etapa adicional de cromatografía de afinidad sobre un soporte que comprende unos oligosacáridos antigénicamente similares a los grupos sanguíneos A y B.