

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 383**

51 Int. Cl.:

C07K 14/75 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2013 PCT/EP2013/054983**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13135684**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2013 E 13709190 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2825555**

54 Título: **Procedimiento mejorado de producción de fibrinógeno y fibrinógeno producido por el mismo**

30 Prioridad:

13.03.2012 EP 12159276
13.03.2012 US 201261610030 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.11.2017

73 Titular/es:

OCTAPharma AG (100.0%)
Seidenstrasse 2
8853 Lachen, CH

72 Inventor/es:

SCHULZ, PETRA;
GEHRINGER, WERNER;
PAPE, RAINER;
LEITINGER, CAROLINE;
SCHÖN, FRIEDRICH y
RÖMISCH, JÜRGEN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 642 383 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 mejorado de producción de fibrinógeno y fibrinógeno producido por el mismo

La presente invención se refiere a un procedimiento de purificación de fibrinógeno procedente de una fuente que contiene fibrinógeno, un producto de fibrinógeno que puede obtenerse según el procedimiento de la invención, así como una resina de intercambio aniónico seleccionada entre el grupo que consiste en un material de soporte que comprende un esqueleto polimérico hidroxilado con grupos amino terciarios o cuaternarios injertados para la purificación o la fabricación de un producto de fibrinógeno.

Antecedentes de la invención

El fibrinógeno, también conocido como factor I de coagulación, desempeña un papel clave en la hemostasis y cicatrización. Es una glicoproteína sintetizada en el hígado con un peso molecular aparente de 340.000 Da, se compone de dos dímeros, cada uno de ellos construidos por tres pares de cadenas polipeptídicas no idénticas llamadas A α , B β y γ y vinculadas por puentes disulfuro. Circula en el torrente sanguíneo a una concentración de aproximadamente 1,5-4,0 mg/ml. Tras la lesión de los vasos sanguíneos, las plaquetas sanguíneas se activan y se forma un tapón. El fibrinógeno está implicado en la hemostasis primaria que ayuda a la reticulación de las plaquetas activadas.

Se inicia en la activación paralela de la cascada de coagulación. Al igual que el criterio de valoración, el fibrinógeno se convierte en fibrina mediante la liberación proteolítica de fibrinopéptido A y - a un ritmo más lento - fibrinopéptido B por trombina. Los monómeros de fibrina solubles se ensamblan a las fibrillas torsionadas bicatenarias. Posteriormente, estas fibrillas se disponen de forma lateral, dando como resultado fibras más gruesas. Estas fibras se reticularon entonces por FXIIIa a una red de fibrina, que estabiliza el tapón plaquetario por las interacciones de la fibrina con las plaquetas activadas, lo que resulta en un coágulo estable.

Trastornos y deficiencias

La afibrinogenemia congénita es un trastorno hemorrágico poco común, en el que los pacientes padecen coagulación inadecuada de la sangre debido a la falta o mal funcionamiento del fibrinógeno. Este problema médico puede conducir a episodios espontáneos de sangrado o sangrado excesivo después de traumatismos menores o durante los procedimientos intervencionistas.

Las deficiencias adquiridas en fibrinógeno son mucho más comunes que la afibrinogenemia congénita y pueden inducirse por hemodilución u otros eventos, tales como pérdidas de sangre durante la cirugía, traumatismos, coagulación intravascular diseminada (CID) o sepsis.

Las deficiencias de fibrinógeno pueden corregirse a los niveles normales de fibrinógeno en plasma de aproximadamente 1,5-4 g/l por la terapia de reemplazo con infusión intravenosa de plasma reciente congelado o crioprecipitado. No obstante, estos tratamientos están afectados por el riesgo de introducción de patógenos, por ejemplo, virus o priones, en un paciente y están generando de ese modo trastornos adicionales. Por tanto, es aconsejable aplicar por vía intravenosa composiciones de fibrinógeno inactivadas por virus para restaurar fibrinógeno a niveles fisiológicos de una manera segura.

Si bien existe fibrinógeno en preparaciones llamadas pegamento de fibrina, adhesivo de fibrinógeno, pegamento tisular y similares, estas preparaciones tienen por objeto su uso tópico como polvos, pastas, espumas o en combinación con tejidos como emplasto en las heridas, que no son utilizables para la aplicación intravenosa ya que su consistencia y composición iniciarían inmediatamente eventos trombóticos cuando se inyectan. Estas preparaciones contienen adicionalmente trombina, sales de calcio y cantidades relativamente altas de factor XIII de coagulación. Ejemplos de tales preparaciones se encuentran en los documentos US-A1-2008/003272, WO-A-95/22316 o US-A1-2008/181878.

Los procedimientos de producción de fibrinógeno se conocen de EP-A1-1 240 200 que se refiere a un procedimiento de purificación de fibrinógeno a partir de una solución que contiene fibrinógeno, que comprende, la aplicación de una solución que contiene fibrinógeno a una matriz de intercambio iónico, en condiciones tales que el fibrinógeno se une a la matriz, el lavado de la matriz de intercambio iónico con una solución tampón que comprende al menos un ω -aminoácido, la elución del fibrinógeno de la matriz con un tampón que consiste en Tris 10 mM, citrato 10 mM, sacarosa 45 mM y NaCl a una concentración de 200 mM a 1,0M, y opcionalmente la recuperación del fibrinógeno a partir del eluato.

El documento EP-A1-0 771 324, con referencia al documento WO-A1-96/02571, se refiere a un procedimiento de producción de un concentrado de fibrinógeno libre de virus que se obtiene por sometimiento de una fracción de plasma solubilizada que contiene fibrinógeno a un tratamiento químico de inactivación viral, es decir, un tratamiento con D/D o con disolvente/detergente, sometimiento de la fracción inactivada por virus resultante a la precipitación en una solución que contiene un aminoácido a un pH ácido para obtener un sobrenadante, filtración del sobrenadante para obtener un concentrado de fibrinógeno purificado y recuperación del concentrado de fibrinógeno purificado. El concentrado de fibrinógeno recuperado se somete a radiación ultravioleta para una segunda inactivación viral. El

producto se estabiliza y liofiliza antes de la tercera etapa de inactivación viral.

El documento EP-A1-1 519 944 enseña el uso de una matriz de cromatografía de afinidad por ion metálico inmovilizado en condiciones que el fibrinógeno y el plasminógeno se unen a la matriz, y elución selectiva del fibrinógeno y el 93 % de plasminógeno separado de la matriz.

5 El documento EP-A1-0 555 135 desvela un procedimiento de producción de un fibrinógeno aplicable por vía intravenosa por purificación de una solución de fibrinógeno por medio de un gel de intercambio aniónico basado en agarosa reticulada que comprenden grupos amina cuaternarios. Se dice que el fibrinógeno producido está libre del factor VIIIc.

10 El documento EP-A1-1 457 497 se refiere a un procedimiento de eliminación de virus en soluciones de fibrinógeno que se caracterizan por la estabilización y la congelación de la solución y posterior descongelación de la misma. La separación de los materiales no disueltos se produce antes de la dilución de la proteína y es seguida por nanofiltración de la solución resultante usando filtros de un tamaño de poro más pequeño que 35 nm.

El documento US-A1-2006/0009376 también desvela un procedimiento de fabricación de fibrinógeno, seguido de la disolución repetida y la precipitación de fibrinógeno para eliminar el factor XIII.

15 El documento WO-A2-2009/155626 se refiere a un procedimiento de purificación de fibrinógeno por solubilización de crioprecipitado o fracción Cohn I en una solución de EDTA en un intervalo de temperatura de 3 °C a 5 °C, seguido por precipitación fraccionada en un intervalo de temperatura de 2 °C a 4 °C y disolución del último precipitado en una solución de EDTA. La inactivación viral con reactivos de D/D y nanofiltración para la mejora de la seguridad de patógenos se produce en presencia de EDTA. La inhibición de cantidades residuales de proteasas en el
20 concentrado producido se logra mediante la adición de AT-III, cofactor de heparina II e inhibidor de la esterasa C1.

El documento US-B2-7.919.592 describe un procedimiento de eliminación de virus a partir de soluciones de fibrinógeno mediante la adición de sustancias caotrópicas, seleccionadas entre arginina, guanidina, citrulina y urea, sales o derivados y la posterior filtración a través de nanofiltros de diversos tamaños de poro.

25 Goheen, S. C. y col. notifican en *Journal of Chromatography A*. 816 (1998) 89-96, sobre la cromatografía de intercambio iónico por HPLC de las proteínas plasmáticas de albúmina, fibrinógeno, e inmunoglobulina (G) sobre materiales de columna no porosos que contienen o bien grupos funcionales de amina cuaternaria o bien de sulfopropilo.

30 El documento US 6.037.457 describe procedimientos de producción de fibrinógeno recombinante en un sistema de cultivo de células de mamífero a largo plazo. El documento menciona una etapa de precipitación en la purificación de fibrinógeno usando NH₄SO₄ al 40 % en presencia de EDTA.

35 El documento US-A1-2011/0114524 describe un procedimiento de producción de una solución de fibrinógeno a partir de una solución acuosa que contiene fibrinógeno funcionalmente intacto y está contaminado con profibrina y/o con monómeros de fibrina y/o complejos monoméricos de fibrina y/o productos de escisión de fibrina. Se dice que las contaminaciones se precipitan utilizando un agente de precipitación no desnaturalizante a una temperatura que oscila entre -4 °C y +4 °C y una actividad de ion calcio que no excede la de la solución de 1.000 µM de CaCl₂.

40 El documento EP-A1-1739093 se refiere a un procedimiento de separación de las proteínas fibrinógeno, factor XIII y pegamento biológico, y de preparación de concentrados liofilizados altamente purificados de dichas proteínas. El documento también se refiere a dichos concentrados liofilizados obtenidos mediante el procedimiento. En el procedimiento descrito en el mismo, la fracción de Cohn I se precipita en un tampón que comprende una mezcla de glicina 1M y citrato trisódico 0,055M a un pH de 6,8.

El documento WO-A1-01/48016 se refiere a procedimientos de purificación de fibrinógeno de precipitado de fracción I en plasma. En la producción, el fibrinógeno se extrae del precipitado usando un tampón de extracción, que puede comprender citrato trisódico, NaCl y heparina.

Sumario de la invención

45 Un objetivo de la invención es proporcionar un concentrado de fibrinógeno fabricado con etapas de eliminación y/o inactivación de patógenos dedicados en el procedimiento de producción a fin de superar las reacciones adversas o desarrollo de enfermedades relacionadas con patógenos. Dichos patógenos se seleccionan entre los grupos de bacterias, virus y priones, tales como proteína priónica scrapie (PrP^{Sc}).

50 La nanofiltración es un procedimiento conocido en principio por eliminar los virus de las proteínas que atraviesan el nanofiltro, pero la separación de virus del fibrinógeno por nanofiltración es difícil ya que el fibrinógeno es una proteína muy grande y pegajosa que con frecuencia provoca el taponamiento de los poros del filtro y la eventual pérdida del producto. Un enfoque para superar este problema es añadir sustancias caotrópicas para mejorar la filtrabilidad como se enseña en el documento US-B2-7.919.592, aunque la nanofiltración de una solución de fibrinógeno diluido producida según el procedimiento de la solicitud internacional WO-A1-2012/038410 reveló

filtrabilidad comparable sin adición de sustancias caotrópicas. Las sustancias caotrópicas según la invención son aquellas que se definen en el documento US-B2-7.919.592 incorporado por referencia y designan arginina, guanidina, citrulina y urea, sus sales o derivados.

5 Un objetivo adicional de la presente solicitud es proporcionar un procedimiento de fabricación de un concentrado en un nivel industrial, es decir, varios cientos a miles de litros de material de partida, tal como sangre o plasma sanguíneo, aunque una producción a pequeña escala, es decir, unos 1/10 litros a algunos litros, también es posible.

Estos y otros objetivos se consiguen mediante un procedimiento de las reivindicaciones 1 a 18, un producto reivindicado en las reivindicaciones 19 a 24 que puede obtenerse por el procedimiento de la invención y el uso de la reivindicación 25.

10 La figura 1 representa un SDS-PAGE en condiciones no reductoras mientras que la figura 2 representa un SDS-PAGE en condiciones reductoras de las mismas muestras.

Según la presente invención, se ha observado sorprendentemente que la precipitación de un producto intermedio de pasta de fibrinógeno en presencia de una o más sustancias quelantes seguido de la extracción de fibrinógeno a partir del producto intermedio proporcionado en una solución de fibrinógeno de una mejor filtrabilidad que los producidos por el procedimiento del documento WO-A1-2012/038410.

15 Se observó además sorprendentemente, que una adición única de una cantidad bastante pequeña de al menos un agente quelante antes de la precipitación, que resulta en una concentración total de agente quelante de aproximadamente 3-10 mM, es suficiente para que la presente invención proporcione un rendimiento y filtrabilidad excelentes, incluso con nanofiltros que proporcionan la retención de partículas de <35 nm. Las cantidades residuales de agente quelante pueden eliminarse aguas abajo proporcionando un producto final, es decir un concentrado de fibrinógeno que está libre de agente quelante dentro del límite de detección, que es inferior a 0,08 µg/ml para EDTA. Un producto libre de agentes quelantes es preferible como, por ejemplo, EDTA que es un anti-coagulante conocido. Así, la presencia de EDTA en cantidades sustanciales es contraproducente para los efectos de un producto de fibrinógeno.

25 En consecuencia, todos los tampones usados aguas abajo de la precipitación, por ejemplo, tampones de equilibrio, lavado y elución usados para cromatografía o el tampón usado durante la concentración por ultra/diafiltración, deben estar libres de agentes quelantes de Ca²⁺, que se definen a continuación. Las cantidades residuales de agentes quelantes presentes eventualmente son extraíbles a partir de una solución que contiene fibrinógeno por ultra/diafiltración. Esta eliminación se realiza ventajosamente por ultra/diafiltración al final del procedimiento, en particular, durante la concentración o la formulación, si fuera necesario. La aplicación sistémica de dicho producto de fibrinógeno libre de agentes quelantes por vía intravenosa permite el tratamiento de afibrinogenemia congénita y las deficiencias de fibrinógeno adquiridas. La aplicación de este concentrado de fibrinógeno estandarizado permite un tratamiento rápido en situaciones de emergencia sin el descongelamiento prolongado de plasma reciente congelado y la disminución de la carga del volumen y las propiedades de coagulación fiables debido esencialmente a una composición constante. El aumento de las concentraciones del factor XIII de coagulación, en comparación con productos desvelados en el documento WO-A1-2012/038410 también soporta la administración tópica en heridas o el uso como pegamento tisular.

40 Se observó además sorprendentemente, que una adición de inhibidores de proteasa en cualquier etapa del procedimiento de la invención era innecesaria cuando el producto intermedio de pasta de fibrinógeno se precipitó en presencia de una o más sustancias quelantes. El uso de inhibidores de la proteasa, tales como inhibidores de la proteasa C1, inhibidores de tripsina, inhibidores de trombina, antitrombina-III (AT-III), cofactor de heparina II, aprotinina, pepstatina, leupeptina y en particular ácido épsilon-aminocaproico (ε-ACA) para evitar la degradación del fibrinógeno se conoce de la literatura de la técnica anterior. El concentrado de fibrinógeno de la presente invención no representó ni una actividad proteolítica medible ni una concentración medible de AT-III.

45 En general, el procedimiento de la invención para la purificación o la fabricación de fibrinógeno a partir de fuentes que contienen fibrinógeno comprende las etapas de:

- formación de un precipitado enriquecido con fibrinógeno mediante la adición de un agente quelante antes de la adición de al menos un agente de precipitación a la fuente que contiene fibrinógeno;
- aislamiento del precipitado enriquecido con fibrinógeno por ejemplo por centrifugación de dicho precipitado;
- 50 - extracción del fibrinógeno a partir del precipitado enriquecido con fibrinógeno en un medio acuoso que carece del agente quelante y formación con ello de una solución que contiene fibrinógeno, opcionalmente seguido de filtración y/o ultra/diafiltración;
- sometimiento de la solución que contiene fibrinógeno a una cromatografía en una fase estacionaria que tiene grupos intercambiadores aniónicos fuertes poniendo en contacto dicha solución con dicha fase en condiciones para que el fibrinógeno se una a dicha fase;

- seguido por una elución de fibrinógeno a partir de la fase estacionaria por medio de una solución acuosa que tiene una fuerza iónica superior a la fuerza iónica de la etapa anterior, obteniéndose una fracción enriquecida con fibrinógeno que se recoge;

5 - seguido opcionalmente por etapas subsiguientes de dilución y/o concentración de la fracción enriquecida con fibrinógeno;

- y, opcionalmente, relleno de la fracción enriquecida con fibrinógeno en viales adecuados, mientras se omite la adición de inhibidores de la proteasa.

10 En una realización del procedimiento de fabricación de la invención, la fuente que contiene fibrinógeno se selecciona entre el grupo que consiste en, plasma sanguíneo, fracciones de plasma, tal como fracción I o crioprecipitado, cultivos celulares productores de fibrinógeno y/o sobrenadantes de dichos cultivos celulares. Si no se usa crioprecipitado como material de partida, un producto intermedio que contiene fibrinógeno como material de partida se produce por procedimientos bien conocidos como se desvela por Cohn, Kistler-Nitschmann y modificaciones de los mismos.

15 Para la obtención de un producto usable farmacéutico resulta ventajoso que la fuente que contiene fibrinógeno se someta a al menos un procedimiento de inactivación viral, por ejemplo, un procedimiento de detergente disolvente como se desvela en el documento EP-A1-0 131 740 incorporado por referencia.

Según otra realización de la invención, la inactivación viral se realiza antes de formar un precipitado enriquecido con fibrinógeno. No obstante, también es posible realizar una inactivación viral en un paso diferente.

20 Según otra realización de la invención, la eliminación de sustancias de inactivación de virus se realiza mediante la extracción de aceite y/o cromatografía con intercambiadores aniónicos fuertes. Otro procedimiento de eliminación de virus es la nanofiltración, debido al bajo contenido de polímeros después de la nanofiltración de extracción de fibrinógeno que puede realizarse también con filtros <35 nm sin adición de sustancias caotrópicas.

25 Un agente de precipitación típico para su uso en el procedimiento de fabricación de la invención se selecciona entre el grupo que consiste en aminoácidos, tales como glicina, polietilenglicol o altas concentraciones de sal, en las que la sal contiene iones metálicos monovalentes, en particular seleccionados entre el grupo de los metales alcalinos o amonio.

Según otra realización de la invención, la extracción de fibrinógeno a partir del precipitado enriquecido con fibrinógeno se realiza con un tampón que tiene un pH de 7,5 a 8,5 durante 10 a 120 minutos.

Según una realización adicional de la invención, la fase estacionaria tiene grupos amino terciarios o cuaternarios.

30 Las etapas de cromatografía en el procedimiento de fabricación de la invención pueden, en particular, realizarse en una columna.

Normalmente, la forma de almacenamiento de la fracción enriquecida con fibrinógeno relleno se encuentra en estado líquido, estado congelado, preferentemente a <-15 °C, más preferentemente por debajo de -30 °C o como liofilizado.

35 El procedimiento de la invención comprende con detalle las etapas de

a) solubilización de crioprecipitado, solubilizado a aproximadamente pH neutro,

b) sometimiento de la solución a una adsorción con $Al(OH)_3$ y eliminación del gel resultante,

c) inactivación viral de la solución resultante de la etapa b) mediante un tratamiento con disolvente/detergente (D/D), extracción de reactivos de D/D con aceite vegetal y puesta en contacto de la fase acuosa con una resina TMAE,

40 d) adición de al menos un agente quelante para obtener una concentración de agente quelante por ejemplo de 3 mM a 100 mM en la fase acuosa resultante de la etapa c),

e) precipitación de fibrinógeno a partir del agente quelante que contiene la fase acuosa de la etapa d), mediante la adición de glicina hasta que se alcanza una concentración final de glicina a aproximadamente 1M, y separación de la pasta de fibrinógeno resultante,

45 f) extracción de fibrinógeno de la pasta de fibrinógeno por un tampón Tris 20 mM a un pH de aproximadamente 8,0, filtración y,

50 g) carga de la solución filtrada de la etapa f) en una resina de intercambio aniónico que comprende grupos trimetil-amino injertados en un esqueleto polimérico metacrílico hidroxilado a través de grupos de enlace y eliminación por lavado de sustancias débilmente unidas con un tampón de lavado con una conductividad de aproximadamente 12,0 mS/cm,

h) elución de fibrinógeno con un tampón de elución que contiene aproximadamente 1,5 g/l de citrato de sodio, aproximadamente 7,0 g/l de cloruro de sodio y aproximadamente 10,0 g/l de glicina, en particular, ajustado a un pH de aproximadamente 7,0 y una conductividad de 13,1-15 mS/cm,

i) filtración sobre al menos un nanofiltro,

5 j) concentración, formulación, esterilización por filtración, relleno y opcionalmente liofilización.

El objeto de la presente invención es también una fracción enriquecida con fibrinógeno que puede obtenerse según el procedimiento de fabricación de la invención.

10 El concentrado de fibrinógeno se rellena en recipientes finales después de la esterilización por filtración y puede almacenarse en forma líquida, congelada líquida o liofilizada. Los recipientes adecuados son viales o botellas de vidrio o bolsas de plástico que comprenden eventualmente una membrana que permite la liofilización, mientras que la bolsa esté completamente sellada para fluidos.

15 El fibrinógeno producido según este procedimiento se caracteriza por cantidades muy bajas de impurezas que determinan el nacimiento del producto y permite el tratamiento a largo plazo de las personas en necesidad. FXIII es preferible a la concentración contenida, puesto que soporta la estabilización de la fibrina formada, mientras que se evita una sobrecarga de esta transglutaminasa.

El término "que comprende", "comprender" o "comprende" también puede reemplazarse con "que consiste", "consistir" o "consiste", sin alterar la divulgación de la descripción.

Descripción detallada

20 Aunque en principio todas las fuentes que contienen fibrinógeno se pueden usar según la invención, el crioprecipitado es una fuente preferente y en lo siguiente el crioprecipitado sirve como una fuente típica de fibrinógeno en la descripción adicional del procedimiento de fabricación de la invención.

25 Normalmente, el crioprecipitado se reconstituye o solubiliza en condiciones de tampón adecuadas, en particular, a aproximadamente un pH neutro (6,9-7,0 por ejemplo en un tampón de solución que contiene Na-citrato y NaCl), se somete a adsorción en particular con $\text{Al}(\text{OH})_3$ y el gel resultante se elimina, por ejemplo, por centrifugación. El sobrenadante puede entonces volverse inactivado por virus por ejemplo por tratamiento con disolvente/detergente (D/D). Este procedimiento es bien conocido por el experto y se ha descrito originalmente en el documento EP-A1-131 740. Los compuestos de D/D, tal como Triton (O-[4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenoxi]-polietoxietanol) y TnBP (tri-n-butil-fosfato) se eliminan, en particular, por extracción con aceite de ricino. Para la purificación adicional, la fase acuosa puede someterse a un procedimiento cromatográfico. Normalmente, esto se puede realizar poniendo en contacto la fase acuosa con un gel de intercambio aniónico fuerte, tri-metil-amino-etil (TMAE) injertado en el material de matriz, tal como Fractogel[®] EMD-TMAE. Se consiguen buenos resultados si la cromatografía se realiza con tampones que tienen un valor de pH de 6,9-7,1 y una osmolalidad de 570-610 mosmol/l. En estas condiciones, el fibrinógeno no se une a la fase estacionaria y por ende se encontró en el flujo continuo o sobrenadante, el último si se realiza un procedimiento por lotes-cromatografía.

35 La solución de fibrinógeno no unido, que contiene normalmente aproximadamente 40 g/l (procedimiento turbidométrico de Clauss) se ajusta a un pH = 7,0-8,0, en particular, a un pH = 7,3-7,5, con un tampón que contiene al menos un agente quelante. Los agentes quelantes adecuados son agentes quelantes de Ca^{2+} en particular ácido 1,2-bis(o-amino)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), ácido dietileno-triamina-pentaacético (DTPA), ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), ácido etileno-glicol-tetraacético (EGTA) y ácido nitrilo-triacético (NTA) a concentraciones de 3 mM a 100 mM, en particular de 5 mM a 50 mM, incluso más particularmente de 5 mM a 20 mM. A partir de entonces, un agente de precipitación adecuado, por ejemplo glicina, se añade para terminar en una concentración de 0,8-1,2 M, en particular 0,9-1,1 M, la solución resultante puede agitarse durante 60-120 min para precipitar el fibrinógeno. La precipitación puede realizarse en un intervalo de temperatura de + 4,1 °C a + 40 °C, siempre y cuando se omita la crioprecipitación, en particular en el intervalo de + 5 °C a 37 °C, más particularmente de 5,1 °C a 30 °C, incluso más en particular a 10 -20 °C. El precipitado que contiene fibrinógeno se puede separar por centrifugación y este producto intermedio de pasta de fibrinógeno podría almacenarse a <-60 °C, preferentemente de -100 °C a -65 °C, durante al menos 6 meses, si el producto intermedio de pasta de fibrinógeno no se procesa de inmediato, pero se prefiere un tiempo de almacenamiento de 1 día hasta 6 meses. Ya una sola precipitación por ejemplo con glicina proporciona una pasta de fibrinógeno suficientemente pura para su posterior procesamiento.

55 El fibrinógeno se extrae entonces del producto intermedio preparado de este modo por un tampón tris(hidroximetil)aminometano 10-30 mM (tampón Tris) libre de agente quelante a un valor de pH de 7,5 a 8,5, en particular un tampón Tris 15-25 mM con pH = 7,5-8,5. La extracción tiene lugar durante 10-120 minutos, en particular durante 15-90 minutos, incluso más en particular, durante 20-60 minutos durante la agitación. La suspensión obtenida puede entonces separarse por filtración y someterse a ultra/diafiltración por ejemplo contra 5 veces el volumen de la suspensión de la misma o un tampón diferente.

La solución que contiene fibrinógeno resultante se carga entonces en un gel de intercambio aniónico seleccionado preferentemente entre un grupo de grupos amino terciarios o cuaternarios como ligandos injertados a una matriz. Dichos grupos funcionales se seleccionan entre el adecuadamente conocido dietilaminoetil (DEAE) o, en el caso de un gel de intercambio aniónico fuerte, entre grupos, tales como trimetilamino, trimetilaminoetil (TMAE) y otros grupos, mientras que el material portador puede componerse de celulosa, agarosa, sílice o material polimérico o cerámico. Los buenos resultados, en particular en la reducción de la fibronectina y la vitronectina, se pueden lograr con grupos trimetil-amino injertados en un polímero metacrílico hidroxilado a través de un grupo de enlace, tal como GigaCap Q-650M[®]. Esto es muy sorprendente, ya que Marco-Prep High Q[®] es químicamente similar, un copolímero metacrílico compuesto de dietilenglicoldimetacrilato/glicidilmetacrilato también con ligandos trimetilamino pero no alcanza la funcionalidad hidroxila en su esqueleto polimérico, es menos eficiente en la reducción de dichas dos proteínas. La reducción eficaz de la fibronectina pegajosa es muy ventajosa para filtraciones opcionales, tales como ultra/diafiltración o nanofiltración, ya que la vida útil de los filtros se aumenta debido a la reducción de la obstrucción. Si el procedimiento tiene por objeto incluir nanofiltración, se prefiere realizar el procedimiento con una solución diluida, en particular, con una cascada de nanofiltros. El gel o resina cromatográfico es, en particular, pre-equilibrado con el mismo tampón que el usado para volver a suspender el producto intermedio de pasta de fibrinógeno antes de aplicar la solución de fibrinógeno. Las sustancias unidas débilmente se eliminan por lavado con tampón de equilibrio seguido de tampón de lavado (1,5 g/l de citrato de sodio, 6,0 g/l de cloruro sódico, ajustado a pH = 6,8-7,2, preferentemente 6,9-7,1, y poseen una conductividad de 11,0-13,0 mS/cm a una temperatura ambiente de 20-25 °C).

El fibrinógeno se puede eluir después de la columna cromatográfica con un tampón de elución que contiene 1,5 g/l de citrato de sodio, y 10,0 g/l de glicina, en particular, ajustado al mismo intervalo de pH que el tampón de lavado por ejemplo por HCl y/o NaOH y ajustado con aproximadamente 7,0 g/l de NaCl con una conductividad de 13,1-15 mS/cm a una temperatura ambiente de 20 °C-25 °C. Aproximadamente el 74 % del fibrinógeno aplicado sobre la columna se recupera en el eluato, mientras que la fibronectina se elimina casi completamente del eluato que contiene fibrinógeno. Ventajosamente se realiza una filtración, en particular, una nanofiltración.

Esta solución de fibrinógeno filtrada adicionalmente se puede concentrar por ultra/diafiltración a aproximadamente 20-26 g/l y por esterilización por filtración con membranas de <0,2 µm de tamaño de poro nominal. Los expertos en la materia saben que otras concentraciones, tales como 1-19,9 g/l o 26,01-30 g/l o incluso superiores también son alcanzables. El concentrado de fibrinógeno de la presente invención también se puede formular con aditivos similares a estabilizadores conocidos por el experto en la materia, tales como hidratos de carbono, por ejemplo sacarosa, trehalosa, aminoácidos, por ejemplo, glicina, histidina, alanina, arginina y detergentes, por ejemplo monooleato de polioxietileno sorbitán (20) (TWEEN 80[®]). Esta masa por esterilización por filtración se almacena a -60 °C o menos, en particular de -65 °C a -80 °C, antes de la esterilización por filtración por una segunda vez y se rellena en recipientes finales y opcionalmente se liofiliza o rellena directamente en los recipientes finales y liofiliza opcionalmente sin una segunda esterilización por filtración.

No es necesario añadir otros tampones, estabilizadores, inhibidores de la proteasa, como AT-III, cofactor de heparina II e inhibidor de la esterasa C1, u otros compuestos, como el factor XIII de coagulación (F XIII). El factor XIII de coagulación está presente en el concentrado con actividades de >0,05 UI por mg de fibrinógeno (procedimiento de Clauss), en particular con actividades de 0,05-0,30 UI/mg. El concentrado de fibrinógeno de la presente invención se caracteriza además por un bajo contenido de compuestos de peso molecular más alto que 340.000 Da de fibrinógeno (APM), determinado como % del área total por cromatografía de exclusión por tamaños a 280 nm. El concentrado de fibrinógeno de la presente invención contiene menos de 11 % de APM, en particular 2-10 % cuando la concentración del agente quelante era al menos 3 mmol/l. El uso de agentes quelantes en concentraciones de al menos 5 mmol/l redujo el contenido de APM al 2-6 %. Una determinada cantidad de albúmina también puede estar presente en una concentración de aproximadamente 16 ng por mg de fibrinógeno. La antitrombina-III (AT-III) y la actividad proteolítica no eran detectables, es decir, una concentración de AT-III inferior a 0,2 UI/ml y una actividad proteolítica inferior a 2 U por litro (<2 U/l), lo que equivale a menos de 0,01 UI de AT-III por mg de fibrinógeno y menos de 0,1 mU de actividad proteolítica por mg de fibrinógeno, cuando se miden en una solución del producto final que contiene fibrinógeno en una concentración de 20 mg/ml. La invención se explica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo I:

El crioprecipitado, producido a partir de plasma por procedimientos establecidos, se reconstituyó o solubilizó a aproximadamente un pH neutro, se sometió a adsorción con Al(OH)₃ y el gel resultante se eliminó por centrifugación. El sobrenadante se inactivó por virus por tratamiento con disolvente/detergente (D/D). Los compuestos de D/D, según el documento EP-A1-0 131 740 se extrajeron con aceite vegetal y la fase acuosa se puso en contacto con EMD-TMAE Fractogel[®]. Se emplearon condiciones cromatográficas (valor de pH de 6,9-7,1 y una osmolalidad de 570-610 mosmol/l), en las que el fibrinógeno no se unió al gel y por ende se encontró en el flujo corriente o sobrenadante.

La solución de fibrinógeno no unido se mezcló con EDTA hasta que la concentración de EDTA alcanzó 10 mM y la solución de fibrinógeno que contiene EDTA se agitó a aproximadamente 15 °C durante aproximadamente 60 minutos después de la adición de glicina (1 mol/l de concentración final y pH = 7,4) para precipitar el fibrinógeno. El

precipitado que contiene fibrinógeno se separó a continuación por centrifugación, obteniéndose un producto intermedio de pasta de fibrinógeno.

5 El fibrinógeno se extrajo por agitación durante aproximadamente 30 minutos del producto intermedio preparado de este modo por un tampón Tris 20 mM (pH = aproximadamente 8,0) que carece de un agente quelante y la suspensión obtenida se filtró a continuación y se sometió a ultra/diafiltración.

10 La solución que contiene fibrinógeno resultante se cargó entonces en GigaCap Q-650M® y el gel o resina cromatográfica se pre-equilibró con el mismo tampón Tris que se usó para la resuspensión antes de aplicar la solución de fibrinógeno. Las sustancias unidas débilmente se eliminaron por lavado con el tampón de equilibrio seguido de lavado con un tampón de lavado (1,5 g/l citrato de sodio, 6,0 g/l de cloruro sódico, ajustado a aproximadamente pH 7,0 y una conductividad de aproximadamente 12,0 mS/cm). A continuación se eluye el fibrinógeno de la columna cromatográfica con un tampón de elución (1,5 g/l de citrato de sodio, y 10,0 g/l de glicina ajustados al mismo pH que el tampón de lavado y ajustado con aproximadamente 7,0 g/l de NaCl con una conductividad de 13,1-15 mS/cm). La nanofiltración se realizó mediante el paso sucesivo de la solución de fibrinógeno sobre nanofiltros de tamaño de poro decreciente desde 75 nm hasta <35 nm.

15 La solución de fibrinógeno resultante se concentró, formuló y esterilizó por filtración. Esta masa esterilizada por filtración se almacenó durante 5 días a -80 °C antes de esterilizarse por filtración una segunda vez y se rellenó en recipientes finales. Una parte de los recipientes finales se liofilizó mientras que la otra parte se mantuvo como una formulación líquida. No se observaron cantidades detectables de agentes quelantes en el producto liofilizado o concentrado líquido.

20 La reconstitución de liofilizados se logró mediante la adición de agua para inyección (API) hasta la concentración antes de la liofilización.

25 Se realizaron los ejemplos II-XII de la misma manera que en el ejemplo I, pero se comprendió la variación de tipo y concentración de los agentes quelantes, así como las variaciones del tiempo de extracción. Si bien los parámetros similares al contenido de proteínas, contenido de antígeno de fibrinógeno o contenido de fibrinopéptido A no se vieron influidos significativamente por estas variaciones al ser normalizadas a 1 mg de fibrinógeno, se observó que el contenido de compuestos de peso molecular más alto (APM) que el fibrinógeno, determinado por cromatografía de exclusión por tamaños, superó el 10 % cuando la concentración del agente complejante fue inferior a 3 mmol/l. El ejemplo XIII se preparó según el procedimiento del documento WO-A1-2012/038410, es decir, sin agente quelante alguno presente durante la purificación. El resultado de estas variaciones se resume en la tabla 1.

30

Tabla 1

Ejemplo	Sustancia	mmol/l	APM %
II	EDTA	1	18
III	EDTA	3	10
IV	EDTA	5	4
V	EDTA	20	4
VI	EDTA	20	4
XIII	-	0	20
XI	EGTA	1	13
XII	BAPTA	1	22
IX	EGTA	5	3
X	BAPTA	5	6
I	EDTA	10	3
VII	EGTA	10	2
VIII	BAPTA	10	4

Se realizó un conjunto de experimentos para determinar un intervalo de tiempo de extracción adecuado como un equilibrio entre el rendimiento y la pureza del producto intermedio de fibrinógeno extraído. Se determinó que el

intervalo de tiempo de extracción adecuado se comprendía entre 10 a 120 minutos, puesto que menos tiempo de extracción proporcionó un producto intermedio muy puro a costa del rendimiento de fibrinógeno, mientras que se observó un exceso de tiempo de extracción de 120 minutos en el que algunas impurezas comenzaron a volverse a disolver sin una ganancia significativa en el rendimiento del fibrinógeno.

5 Comparación con el documento WO-A1-2012/038410.

Una diferencia entre la presente invención y el documento WO-A1-2012/038410 se representa por la adición de un agente quelante antes de la precipitación de fibrinógeno por un agente adecuado de precipitación, como glicina, y el reemplazo de la siguiente etapa de resuspensión en el documento WO-A1-2012/038410 por una extracción. Dicha modificación dio lugar a un aumento inesperado de la actividad del factor XIII de coagulación en el producto final de la presente invención, es decir, hasta 0,30 UI/mg de fibrinógeno (concentración de fibrinógeno de 20-25 mg/ml; determinada por el procedimiento de Clauss), así como un aumento del rendimiento.

La Figura 1 representa un SDS-PAGE en condiciones no reductoras revelando compuestos de peso molecular menos elevado en productos típicos producidos según el procedimiento de la presente invención (los carriles 6-11 se indicaron también como "+") en comparación con el producto de la solicitud de patente WO-A1-2012/038410 (los carriles 2-5 también se indicaron como "-"). La banda de la proteína más cercana a 250 kD representa fibrinógeno mientras que por encima de la banda de fibrinógeno son compuestos de peso molecular más alto. La banda de proteína a aproximadamente 50 kD representa albúmina. El carril 1 muestra los marcadores de peso molecular.

La Figura 2 representa un SDS-PAGE en condiciones reductoras. Los productos ensayados son los mismos que en la figura 1 y en el mismo orden y que se indican por consiguiente de la misma manera que en la figura 1, es decir, "+" para los productos preparados por un procedimiento según la presente invención, mientras que "-" indica productos preparados por un procedimiento según el documento WO-A1-2012/038410. Las bandas principales a aproximadamente 50-70 kD representan las cadenas α -, β y γ de fibrinógeno. La banda de proteína a aproximadamente 100 kD representa el dímero de la cadena γ de fibrinógeno. La banda tenue a aproximadamente 30 kD es causada por fragmentos de fibrinógeno. El carril 1 muestra los marcadores de peso molecular.

25 Comparación con el documento WO-A2-2009/155626.

Las diferencias entre los productos de la presente invención y los del documento WO-A2-2009/155626 se investigaron mediante análisis de los productos preparados por los procedimientos del documento WO-A2-2009/155626, en particular por la combinación de los ejemplos desvelados 1 y 6, lo que resulta en un producto nanofiltrado y liofilizado. Se observó que el producto del documento WO-A2-2009/155626 contenía 1 % de compuestos de peso molecular más alto que el fibrinógeno, determinado por cromatografía de exclusión por tamaños y una actividad del factor XIII de coagulación de aproximadamente 0,41 UI/mg de fibrinógeno.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un procedimiento de purificación de fibrinógeno procedente de una fuente que contiene fibrinógeno por precipitación del fibrinógeno por un agente de precipitación procedente de una solución que contiene fibrinógeno en presencia de uno o más agentes quelantes y eliminación del sobrenadante de la pasta de fibrinógeno, **caracterizado porque** el fibrinógeno se extrae de la pasta que forma una fracción líquida que contiene fibrinógeno, y un residuo no disuelto, que se separa del líquido, mientras se omite la adición de uno o más inhibidores de la proteasa.
- 10 2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que uno o más inhibidores de la proteasa se seleccionan entre inhibidores de la proteasa C1, inhibidores de tripsina, inhibidores de trombina, antitrombina III (AT-III), cofactor de heparina II, aprotinina, pepstatina, leupeptina y ácido épsilon-aminocaproico.
- 15 3.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el uno o más agentes quelantes son un agente quelante de Ca^{2+} seleccionado entre ácido 1,2-bis(o-amino)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), ácido dietilén-triamina-pentaacético (DTPA), ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), ácido etilén-glicol-tetraacético (EGTA) y ácido nitrilo-triacético (NTA).
- 20 4.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la concentración del agente quelante se encuentra en un intervalo de 3 mM a 100 mM.
- 5 5.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la concentración del agente quelante se encuentra en un intervalo de 5 mM a 50 mM.
- 25 6.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la concentración del agente quelante se encuentra en un intervalo de 5 mM a 20 mM.
- 7.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el fibrinógeno se precipita en un intervalo de temperatura de 4,1 °C a 40 °C, en particular en el intervalo de 5 °C a 37 °C, por el agente de precipitación que se selecciona en particular entre el grupo que consiste en aminoácidos, polietilenglicol o una sal en altas concentraciones o combinaciones de los mismos, en el que la sal contiene iones metálicos monovalentes, seleccionados en particular entre el grupo de metales alcalinos o amonio.
- 30 8.- El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el agente de precipitación es un aminoácido, tal como glicina, en particular glicina a aproximadamente 1M.
- 9.- El procedimiento de las reivindicaciones 7 u 8, en el que la pasta de fibrinógeno se extrae durante 10 a 120 minutos, preferentemente en un tampón Tris a aproximadamente 20 mM a un pH de aproximadamente 8,0 para obtener una fracción líquida.
- 35 10.- El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el tampón TRIS carece de agentes quelantes.
- 11.- El procedimiento de la reivindicación 9 o 10, en el que la fracción líquida obtenida se filtra para dar un filtrado que se pone en contacto con una resina de intercambio aniónico que comprende grupos trimetil-amino injertados en un esqueleto polimérico metacrílico hidroxilado a través de grupos de enlace y se elimina por lavado de sustancias débilmente unidas, preferentemente con un tampón de lavado de una conductividad de aproximadamente 12,0 mS/cm.
- 40 12.- El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el fibrinógeno se desorbe de la resina de intercambio aniónico fuerte por medio de un tampón de elución que contiene citrato de sodio, cloruro de sodio, y glicina, de manera preferente aproximadamente 1,5 g/l de citrato de sodio, aproximadamente 7,0 g/l de cloruro de sodio y aproximadamente 10,0 g/l de glicina, en particular ajustado a un pH de aproximadamente 7,0 y una conductividad de 13,1-15 mS/cm.
- 45 13.- El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la solución de fibrinógeno desorbido se nanofiltrada para obtener una fracción nanofiltrada.
- 14.- El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la fracción obtenida se concentra, formula, esteriliza por filtración y/o rellena en recipientes finales adecuados.
- 50 15.- El procedimiento de la reivindicación 14, en el que los recipientes finales se seleccionan entre viales o botellas de vidrio o bolsas de plástico que comprenden eventualmente una membrana.
- 16.- El procedimiento de las reivindicaciones 13 o 15, en el que la fracción obtenida se liofiliza
- 17.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende las etapas de
 - a) solubilización de crioprecipitado, solubilizado a aproximadamente pH neutro,

- b) sometimiento de la solución a una adsorción con $\text{Al}(\text{OH})_3$ y eliminación del gel resultante,
- c) inactivación viral de la solución resultante de la etapa b) mediante un tratamiento con disolvente/detergente (D/D), extracción de reactivos de D/D con aceite vegetal y puesta en contacto de la fase acuosa con una resina TMAE a un valor de pH de 6,9-7,1 y una osmolalidad de 570-610 mosmol/l,
- 5 d) adición de al menos un agente quelante a la fase acuosa resultante de la etapa c),
- e) precipitación de fibrinógeno a partir del agente quelante que contiene la fase acuosa de la etapa d), mediante la adición de glicina hasta que se alcanza una concentración final de glicina a aproximadamente 1M, y separación de la pasta de fibrinógeno resultante,
- 10 f) extracción de fibrinógeno de la pasta de fibrinógeno por un tampón Tris 20 mM a un pH de aproximadamente 8,0, filtración y,
- g) carga de la solución filtrada de la etapa f) en una resina de intercambio aniónico que comprende grupos trimetil-amino injertados en un esqueleto polimérico metacrílico hidroxilado a través de grupos de enlace y eliminación por lavado de sustancias débilmente unidas con un tampón de lavado con una conductividad de aproximadamente 12,0 mS/cm,
- 15 h) elución de fibrinógeno con un tampón de elución que contiene aproximadamente 1,5 g/l de citrato de sodio, aproximadamente 7,0 g/l de cloruro de sodio y aproximadamente 10,0 g/l de glicina, en particular, ajustado a un pH de aproximadamente 7,0 y una conductividad de 13,1-15 mS/cm,
- i) filtración sobre al menos un nanofiltro,
- j) concentración, formulación, esterilización por filtración, relleno y opcionalmente liofilización.
- 20 18.- El procedimiento de la reivindicación 17, en el que la concentración del agente quelante en la fase acuosa es de 3 mM a 100 mM.
- 19.- Un producto de fibrinógeno que puede obtenerse según la reivindicación 18, que tiene menos del 11 % de los compuestos de peso molecular más alto que el fibrinógeno, determinado como % del área total por cromatografía de exclusión por tamaños a 280 nm.
- 25 20.- Un producto de fibrinógeno que puede obtenerse según la reivindicación 18, que tiene 2-10 % de compuestos de peso molecular más alto que el fibrinógeno.
- 21.- Un producto de fibrinógeno que puede obtenerse según la reivindicación 18, que tiene 2-6 % de compuestos de peso molecular más alto que el fibrinógeno.
- 30 22.- El producto de fibrinógeno de las reivindicaciones 19 a 21, que tiene una actividad de factor XIII de coagulación en concentraciones de 0,05-0,30 UI/mg de fibrinógeno.
- 23.- El producto de fibrinógeno de las reivindicaciones 19 a 21, que no tiene cantidad alguna detectable de antitrombina-III (AT-III) o de actividad proteolítica, es decir, una concentración de AT-III inferior a 0,2 UI/ml y una actividad proteolítica inferior a 2 U por litro (<2 U/l), lo que equivale a menos de 0,01 UI de AT-III por mg de fibrinógeno y menos de 0,1 mU de actividad proteolítica por mg de fibrinógeno, cuando se miden en una solución del producto final que contiene fibrinógeno en una concentración de 20 mg/ml.
- 35 24.- El producto de fibrinógeno de las reivindicaciones 19 a 23, **caracterizado porque** es liofilizado.
- 25.- Uso de una resina de intercambio aniónico seleccionada entre el grupo que consiste en un material de soporte que comprende un esqueleto polimérico hidroxilado con grupos amino terciarios o cuaternarios injertados para la purificación o la fabricación de un producto de fibrinógeno de al menos una de las reivindicaciones 19 a 24
- 40 en un procedimiento de de al menos una de las reivindicaciones 1 a 18.

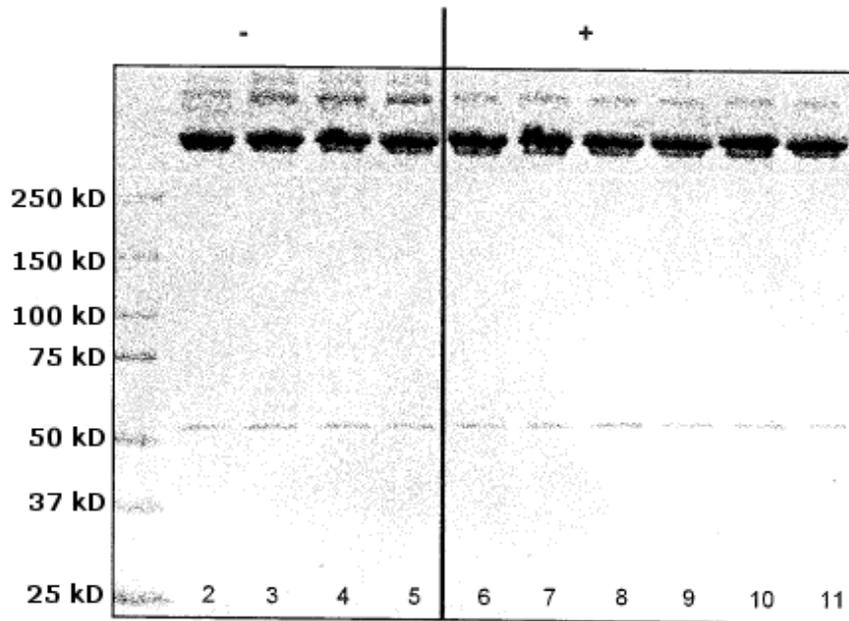


Figura 1

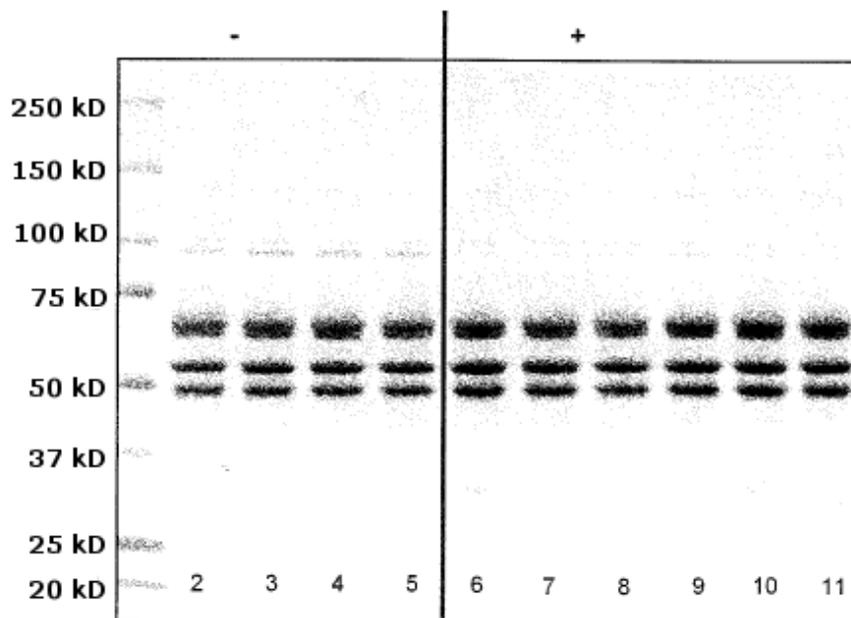


Figura 2