

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 189**

51 Int. Cl.:

A61K 31/727	(2006.01)
A61K 35/16	(2015.01)
A61K 38/57	(2006.01)
A61P 7/02	(2006.01)
A61P 1/00	(2006.01)
A61P 11/08	(2006.01)
A61P 9/06	(2006.01)
A61P 9/12	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2012 PCT/EP2012/058954**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12152953**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2012 E 12719993 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2707005**

54 Título: **Métodos para reducir los eventos adversos causados por preparados farmacéuticos que comprenden proteínas derivadas del plasma**

30 Prioridad:

12.05.2011 EP 11165869
17.05.2011 US 201161487205 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.12.2017

73 Titular/es:

CSL BEHRING GMBH (100.0%)
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE

72 Inventor/es:

SCHULTE, STEFAN;
KALINA, UWE;
MOSES, MICHAEL y
FEUSSNER, ANNETTE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 648 189 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para reducir los eventos adversos causados por preparados farmacéuticos que comprenden proteínas derivadas del plasma

5 La presente invención proporciona un método para reducir la actividad del Factor XIa en un preparado farmacéutico derivado de una fracción de plasma que comprende antitrombina III, donde la fracción de plasma se ha preadsorbido a una matriz de intercambio aniónico (AEX, por sus siglas en inglés) y el método comprende poner en contacto la fracción de plasma con heparina, lo que reduce así la actividad de Factor XIa por mL de la fracción de plasma; donde la heparina que se pone en contacto con la fracción de plasma está covalentemente unida a una matriz, donde la matriz de AEX es una membrana de intercambio aniónico.

10 En el modelo de cascada clásico, la coagulación sanguínea tiene lugar mediante una serie de reacciones que implican la activación de zimógenos mediante proteólisis limitada que culmina con la generación de trombina, la cual convierte el fibrinógeno plasmático en fibrina y activa las plaquetas. A su vez, las plaquetas que se adhieren a colágeno o fibrina facilitan la generación de trombina en varios órdenes de magnitud mediante la exposición de fosfolípidos procoagulantes (principalmente fosfatidilserina) en su superficie exterior, lo que propaga el ensamblaje y la activación de complejos de proteasas de la coagulación, y mediante la interacción directa entre los receptores de plaquetas y los factores de coagulación.

15 Existen dos vías convergentes para la coagulación que están desencadenadas por componentes extrínsecos (pared vascular) o intrínsecos (transportados por la sangre) del sistema vascular (Figura 1). La vía “extrínseca” es iniciada por el complejo de la serinproteasa factor VII (FVII) con la proteína integral de membrana factor tisular (TF, por sus siglas en inglés), un cofactor de la coagulación esencial que se encuentra ausente en la superficie luminal pero expresado en gran medida en las capas subendoteliales del vaso y que es accesible o se libera a través de una lesión tisular. El TF expresado en microvesículas circulantes podría contribuir también a la propagación del trombo sustentando la generación de trombina en la superficie de las plaquetas activadas.

20 La “vía intrínseca” o “vía de activación por contacto” se inicia cuando la serinproteasa factor XII (FXII, factor de Hageman) entra en contacto con superficies cargadas negativamente en una reacción que involucra al cininógeno de alto peso molecular y la serinproteasa calicreína plasmática (activación por contacto). El FXII puede ser activado por constituyentes macromoleculares de la matriz subendotelial tales como glicosaminoglicanos y colágenos, sulfátidos, nucleótidos y otros polianiones solubles o materiales no fisiológicos tales como vidrio o polímeros. Uno de los activadores por contacto más potentes es el caolín y esta reacción sirve como base mecánica para la principal prueba de coagulación clínica, el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT, por sus siglas en inglés), que mide la función de coagulación de la vía “intrínseca”. En las reacciones propagadas por las plaquetas, el FXII activado activa a continuación la serinproteasa FXI a FXIa y posteriormente FXIa activa la serinproteasa FIX a FIXa. El complejo de FVIIIa, donde dicho FVIIIa ha sido activado previamente por trazas de FXa y/o trombina, y FIXa (el complejo tenasa) posteriormente activa la serinproteasa FX a FXa, que a su vez activa con FVa la serinproteasa protrombina a trombina.

30 El factor XIIa tiene una serie de proteínas objetivo, incluidas la precalicreína plasmática y el factor XI. La calicreína plasmática activa además activa el factor XII, lo que conduce a una amplificación de la activación por contacto. La activación por contacto es un proceso mediado por superficies responsable en parte de la regulación de la trombosis y la inflamación, y está mediado, al menos en parte, por la vía fibrinolítica, del complemento, de cininógeno/cinina y otras vías celulares y humorales. El precursor inactivo de la calicreína plasmática, la precalicreína, se sintetiza en el hígado en forma de α -globulina monocatenaria con un peso molecular de aproximadamente 88 kilodalton (kDa) [3]. La precalicreína circula en el plasma en forma de complejo 1:1 con el HMWK con una concentración de 35-50 $\mu\text{g/mL}$. La calicreína se forma mediante la escisión de la precalicreína en dos cadenas que se mantienen juntas mediante un puente disulfuro. La activación de la precalicreína a calicreína viene provocada por el FXII activo (FXIIa). La calicreína plasmática activa escinde del HMWK el péptido bradicinina, muy activo biológicamente, que produce una fuerte disminución de la presión sanguínea, un aumento de la permeabilidad vascular, la liberación del activador de plasminógeno tisular (t-PA) y la movilización del ácido araquidónico. A través de estos mecanismos, el sistema calicreína-cinina influye en la regulación de la presión sanguínea, la función renal y cardíaca, así como los procesos patológicos de inflamación (para consultar una revisión, remítase a Coleman, R. *Contact Activation Pathway*, páginas 103-122 en *Hemostasis and Thrombosis, Lippincott Williams Wilkins* 2001; Schmaier A. H. *Contact Activation*, páginas 105-128 en *Thrombosis and Hemorrhage*, 1998).

40 En algunas afecciones patológicas, la cascada de coagulación se puede activar de forma inapropiada, lo que da lugar a continuación a la formación de tapones que actúan de forma hemostática en el interior de los vasos sanguíneos. Por ende, los vasos pueden ocluirse y el suministro de sangre a los órganos distales se limita. Además, la trombina formada se puede desprender y producir embolias en otras partes del cuerpo, lo que da lugar a oclusión isquémica. Este proceso se conoce como tromboembolismo y está asociado con una elevada mortalidad.

5 Las proteasas activadas que se originan a partir de proteínas del plasma sanguíneo pueden contaminar los preparados farmacéuticos de proteínas derivadas del plasma sanguíneo humano y pueden ser la causa de eventos tromboembólicos adversos (TAE, por sus siglas en inglés). Los proveedores de productos farmacéuticos derivados del plasma deben garantizar, por tanto, que sus productos no causen tales TAE, que también se han asociado recientemente con el uso de un preparado de inmunoglobulina intravenosa (IVIG). Algunos autores atribuyen al Factor XI de coagulación activado (FXIa) una función relevante en el potencial trombogénico de las IVIG (Alving BM, Tankersley DL, Mason BL, Rossi F, Aronson DL, Finlayson JS. *Contact-activated factors: contaminants of immunoglobulins preparations with coagulant and vasoactive properties. J. Lab. Clin. Med* 1980; 96(2): 334-46).

10 Además de eventos trombóticos como la embolia, un preparado de proteínas del plasma que comprende concentraciones aumentadas de calicreína, FXIa o FXIIa puede causar otros eventos adversos tales como reacciones cutáneas, broncoespasmos, hipoxia, fuertes escalofríos, taquicardia, dolores de estómago y presión sanguínea elevada.

15 El desarrollo de preparados puros y seguros es un objetivo principal de los fabricantes de derivados plasmáticos, que incluye disminuir o eliminar virtualmente el riesgo de TAE asociados a IVIG. Marzo *et al.* describieron que la pasteurización puede ser un medio para reducir las proteasas activadas en los preparados de inmunoglobulinas (Jose M, Marzo N, Bono M, Carretero M, Maite L, Ristol P, Jorquera J. *Pasteurization Inactivates Clotting Enzymes During Flebogamma® And Flebogamma® Dif Production. WebmedCentral IMMUNOTHERAPY* 2010; 1(12): WMC001425).

20 Los métodos dirigidos a prevenir los efectos secundarios no deseados incluyen aquellos descritos en el documento US4388232 (Eibl *et al.*) que añaden antitrombina III o heparina a las fracciones de plasma. En cambio, el documento US2006035828 (Elmaleh) describe métodos para activar la antitrombina III en las fracciones de plasma mediante la adición de heparina con el fin de inhibir serinproteasas, incluida la calicreína, y el uso de tales métodos para prevenir trombosis, embolias y otros trastornos.

25 Wolberg *et al. American J. Hem.* 65:30-34 (2000) examinaron la actividad procoagulante de lotes comerciales de IgG intravenosa (IVIG), con lo que concluyeron que las variaciones en el proceso de fabricación o la fuente de plasma pueden afectar a los niveles de Factor XI residual y que esto podría contribuir al riesgo de trombosis *in vivo* tras una terapia con IVIG.

30 En 2010 se retiró un producto de inmunoglobulina i.v. debido a eventos tromboembólicos (Agencia Europea de Medicamentos. Preguntas y respuestas sobre la suspensión de las autorizaciones de comercialización de Octagram (inmunoglobulina humana normal 5% y 10%). Resultado de un procedimiento realizado de conformidad con el Artículo 107 de la Directiva 2001/83/EC. 23 de septiembre de 2010) que condujo a la suspensión de la autorización de comercialización del respectivo producto.

Existe una clara necesidad médica de desarrollar métodos de fabricación alternativos que se puedan utilizar para mejorar la seguridad de los preparados farmacéuticos derivados del plasma.

35 La presente invención proporciona una solución a este problema.

Se descubrió que la adsorción de un preparado farmacéutico, o su fracción intermedia, derivado del plasma a matrices de tipo heparina o heparina puede reducir sustancialmente la cantidad de proteasas activadas y puede, por tanto, mejorar considerablemente la seguridad de dicho preparado farmacéutico.

40 En un primer aspecto, la invención es un método para reducir la actividad del Factor XIa en un preparado farmacéutico derivado de una fracción de plasma que comprende antitrombina III, donde la fracción de plasma se ha preadsorbido a una matriz de intercambio aniónico (AEX) y el método comprende poner en contacto la fracción de plasma con heparina, lo que reduce así la actividad de Factor XIa por mL de la fracción de plasma; donde la heparina que se pone en contacto con la fracción de plasma está unida covalentemente a una matriz, donde la matriz de AEX es una membrana de intercambio aniónico.

45 La invención no se refiere a un método de tratamiento del cuerpo animal humano (Art. 53c EPC).

50 El contacto de las fracciones de plasma tales como una fracción de plasma que comprende AT III con heparina o una sustancia de tipo heparina, particularmente cuando está covalentemente unida a una matriz (p. ej., resina de afinidad de heparina) proporciona un método general para eliminar las serinproteasas activadas de las fracciones de plasma. Por lo tanto, cuando se introducen fracciones de plasma nuevas o adaptadas como parte de un proceso de fabricación para purificar una proteína del plasma y se descubre que se forman serinproteasas activadas, se pueden aplicar entonces los métodos para eliminar estas serinproteasas activadas.

Preferentemente, en el primer aspecto de la invención la fracción de plasma se obtiene a partir de un fraccionamiento de plasma industrial de Cohn/Oncley o Kistler/Nitschmann. Algunos ejemplos particulares de estos procesos de fraccionamiento se describen en las Figuras 2 y 3. Más preferentemente, la fracción de plasma se

selecciona a partir del grupo compuesto por plasma pobre en crioprecipitado, fracción I del precipitado al 8%, sobrenadante en etanol I al 8%, fracción II + III, sobrenadante II + III, fracción II, sobrenadante II, fracción III, sobrenadante III, fracción IV, sobrenadante IV, fracción V, sobrenadante V, precipitado A o sobrenadante A, precipitado B, sobrenadante B, precipitado C o sobrenadante C. De la forma más preferente, la fracción de plasma es plasma pobre en crioprecipitado o sobrenadante en etanol I al 8%. En una realización particularmente preferida, la fracción de plasma es sobrenadante en etanol I al 8%. Además, también se prefieren las fracciones de plasma que son parte de un proceso de fabricación de inmunoglobulinas.

Sorprendentemente, se ha descubierto que no solo los materiales cargados negativamente pueden activar las serinproteasas, sino que también algunos materiales cargados positivamente tales como resinas o matrices de AEX pueden activar serinproteasas como la calicreína, el Factor XI y el Factor XII. Por tanto, la fabricación de preparados farmacéuticos a partir del plasma que conlleva la exposición a materiales cargados positivamente proporciona el potencial para activar serinproteasas como la calicreína, el Factor XI y el Factor XII. Por tanto, en el primer aspecto de la invención la fracción de plasma se preadsorbe a una matriz de intercambio aniónico (AEX). La matriz de AEX es una membrana de intercambio aniónico. Más preferentemente, se utiliza la matriz de AEX para adsorber el complejo de protrombina (adsorción de PT) y/o para adsorber el inhibidor de c1-esterasa (adsorción de C1).

En algunas realizaciones preferidas del primer aspecto de la invención, la preadsorción de la fracción de plasma a la matriz de AEX comprende poner en contacto un intermedio de la fracción de plasma con la matriz de AEX. Por ejemplo, este intermedio puede ser plasma pobre en crioprecipitado donde la fracción de plasma es sobrenadante en etanol I al 8%.

Se sobreentenderá que se puede poner en contacto más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de la fracción de plasma con heparina o una sustancia de tipo heparina en forma soluble o covalentemente unida a una matriz. Esto contrasta con los métodos de fraccionamiento de plasma actuales donde la adsorción de AT III es un paso opcional y a menudo se lleva a cabo en una proporción relativamente pequeña de la fracción de plasma total.

En las realizaciones de la invención que involucran una fracción de plasma que se ha preadsorbido a una matriz de intercambio aniónico (AEX) se sobreentenderá que preferentemente se pone en contacto más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de la fracción de plasma con la matriz de AEX. Esto contrasta con los métodos de fraccionamiento de plasma actuales, donde tales pasos son opcionales y a menudo se llevan a cabo en una proporción relativamente pequeña de la fracción de plasma total.

El plasma sanguíneo humano se ha utilizado industrialmente durante décadas para la fabricación de productos proteicos del plasma ampliamente consolidados y aceptados tales como, p. ej., preparados de inmunoglobulina (IgG), albúmina humana, concentrados de factores de coagulación (Factor de coagulación VIII, Factor de coagulación IX, 90% de protrombina, etc.) e inhibidores (Antitrombina III, inhibidor de C1, etc.). A lo largo del desarrollo de tales fármacos derivados del plasma, se han consolidado los métodos de fraccionamiento de plasma, lo que ha conducido a productos intermedios enriquecidos en ciertas proteínas, que sirven después como material de partida para el producto proteico del plasma correspondiente. Los procesos típicos se revisan, p. ej., en Schultze HE, Heremans JF; *Molecular Biology of Human Proteins*. Volumen I: *Nature and Metabolism of Extracellular Proteins* 1966, Elsevier Publishing Company; págs. 236-317 y en la Figura 2 (Cohn/Oncley) y Figura 3 (Kistler Nitschmann) se proporcionan representaciones esquemáticas simplificadas de tales procesos.

Como se puede observar fácilmente a partir de las Figuras 2 y 3 los métodos de fabricación implican una serie de pasos que dan como resultado múltiples fracciones de plasma, que comprenden cada una una composición diferente de proteínas derivadas de la fuente de plasma sanguíneo humano. Las fracciones de plasma tales como el plasma pobre en crioprecipitado, el sobrenadante al 8%, la fracción II + III y similares, que requieren pasos adicionales para preparar una proteína del plasma terapéutica a menudo se denominan de forma más general fracciones intermedias, sobrenadantes intermedios, productos intermedios, intermedios o similares. Las fracciones de plasma al final del proceso de fraccionamiento tales como la Fracción II (inmunoglobulinas) y Fracción V (albúmina) de la Figura 2 que se han enriquecido lo suficiente en la proteína derivada del plasma particular (por ejemplo, albúmina) o una mezcla de proteínas particular (por ejemplo, complejo de protrombina (PT)) se confeccionan entonces en forma de preparado farmacéutico (en ocasiones denominado producto farmacológico). Esto puede implicar pasos adicionales relacionados, por ejemplo, con la formulación y reducción de patógenos (remítase al Ejemplo 1.2, más adelante).

Estos tipos de tecnologías de separación permiten la fabricación de varios productos proteicos del plasma terapéuticos a partir de la misma fuente donante de plasma, lo que resulta ventajoso desde el punto de vista económico respecto a la producción de un único producto proteico del plasma a partir de una fuente donante y, por lo tanto, se han adoptado como estándar industrial en el fraccionamiento de plasma sanguíneo. Las fuentes donantes de plasma típicas utilizadas en los procesos de fabricación a escala industrial varían en volumen de plasma desde aproximadamente 5000 litros hasta aproximadamente 70000 litros.

En un primer paso, se precipitan el FVIII, el factor de von Willebrand y el fibrinógeno a partir del plasma

(crioprecipitación) y el plasma pobre en crioprecipitado restante se puede adsorber a matrices para aislar las proteínas del complejo de protrombina (adsorción de PT, PPSB) y/o para adsorber el inhibidor de C1 (adsorción de C1). Normalmente esta adsorción se realiza utilizando matrices de intercambio aniónico (AEX) como DEAE o QAE.

5 En el proceso de Cohn, se lleva a cabo entonces una precipitación con un 8% de etanol que precipita el FXIII y más fibrinógeno. El sobrenadante de etanol al 8% se puede someter directamente a pasos de precipitación adicionales aumentando la concentración de etanol para producir más fracciones de plasma y en última instancia, conducir a preparados farmacéuticos como inmunoglobulinas, albúmina, factor H del complemento, transferrina e inhibidor de proteinasa alfa-1.

10 Opcionalmente, el sobrenadante al 8% se puede adsorber adicionalmente para aislar la antitrombina III (adsorción de AT III). Este paso se lleva a cabo normalmente utilizando heparina o sustancias de tipo heparina.

15 La purificación de AT III a gran escala habitualmente conlleva el uso de la cromatografía de afinidad de heparina, que utiliza heparina o sustancias de tipo heparina unidas a una matriz (remítase a, por ejemplo, Burnouf & Radosevich, 2001, *J. Biochem. Biophys. Methods* 575-586). Estas matrices a menudo se denominan simplemente resinas o medios de afinidad de heparina. Algunos ejemplos de tales resinas de afinidad de heparina incluyen heparina-agarosa, heparina-microesferas acrílicas, heparina-material compuesto de hidrogel Ceramic HyperD, heparina-Poros y heparina-sefarosa. Tales resinas se pueden adquirir listas para usar o se pueden preparar internamente utilizando resinas tales como Fractogel que se puede combinar con heparina o sustancias de tipo heparina.

20 Las resinas de afinidad de heparina habitualmente se empaquetan en una columna y se hace pasar la fracción de plasma a través de la columna (remítase al Ejemplo 1.2) o, como alternativa, se añade directamente a la fracción de plasma en modo por lotes para adsorber la AT III. En este último método, la eliminación de AT III/resina de afinidad de heparina se puede conseguir mediante centrifugación o filtración. La AT III se puede entonces desorber de los medios y se puede llevar a cabo un procesado adicional para elaborar un preparado farmacéutico de AT III. La fracción de plasma empobrecida en AT III se puede someter también entonces a pasos adicionales para preparar otras proteínas derivadas del plasma tales como inmunoglobulinas y albúmina. Cabe señalar que el paso de adsorción a la resina de afinidad de heparina permite que las serinproteasas activadas se unan directa o indirectamente a través de la AT III a la heparina o sustancia de tipo heparina, que se puede eliminar entonces de la fracción de plasma y, por tanto, del preparado farmacéutico.

30 Los procesos de fabricación actuales normalmente permiten alguna flexibilidad de forma que no siempre se realizan todas las adsorciones, en función de la demanda relativa de los diferentes productos. En la producción de inmunoglobulinas y albúmina puede haber:

- 1: Ningún paso de adsorción realizado
- 2: Solamente el paso de adsorción de PT realizado
- 3: Adsorción de PT seguida de adsorción del inhibidor de C1-esterasa
- 35 4: Adsorción de PT seguida de adsorción de AT III
- 5: Proceso completo de adsorción (adsorción de PT, inhibidor de C1-esterasa y AT III)

40 Estos pasos de adsorción se pueden llevar a cabo en la misma fracción de plasma (por ejemplo, se pueden llevar a cabo los pasos de adsorción de PT y C1 en plasma pobre en crioprecipitado) o en fracciones intermedias relacionadas de estos (por ejemplo, la adsorción de AT III se puede llevar a cabo en la fracción de plasma del sobrenadante de etanol I al 8% donde en el intermedio del plasma pobre en crioprecipitado precedente se había adsorbido PT y/o C1).

45 En la Figura 4 se muestra un gráfico que representa dichos métodos de fabricación alternativos. En el Ejemplo 1.2 se describe un ejemplo no limitante de un proceso de fabricación de este tipo. El alcance de la invención, sin embargo, no se limita a los preparados farmacéuticos que comprenden inmunoglobulinas, como se hará evidente más adelante.

50 Se acaba de descubrir que, especialmente después de una adsorción con matrices de AEX durante la adsorción de PT y C1, se podían detectar serinproteasas activadas como calicreína, FXIa o FXIIa en productos posteriores. Sorprendentemente, los preparados farmacéuticos elaborados mediante los métodos en los que además de la adsorción a una matriz de AEX se adsorbieron también a heparina o sustancias de tipo heparina mostraron niveles significativamente reducidos de actividad de tipo FXIa y/o calicreína. Esto deriva en una actividad procoagulante significativamente reducida de los preparados farmacéuticos empobrecidos en AT III. Esta actividad procoagulante reducida disminuye el riesgo de eventos adversos cuando se administra un producto de este tipo a los pacientes. Algunos ejemplos de eventos adversos son eventos tromboembólicos, reacciones cutáneas, broncoespasmos, hipoxia, fuertes escalofríos, taquicardia, dolores de estómago y presión sanguínea elevada.

55 Sin pretender ceñirse a ninguna teoría, este efecto se puede explicar por el hecho de que las matrices de AEX activan el FXII a FXIIa, que a su vez activa la precalicreína a calicreína y el FXI a FXIa. Una adsorción adicional para

eliminar el inhibidor de C1 puede conducir a una activación adicional y también elimina el inhibidor de C1, un inhibidor importante de la calicreína. Cuando estas fracciones que contienen calicreína, FXIa y FXIIa entran en contacto posteriormente con matrices de tipo heparina o heparina, la AT III, la cual normalmente está presente en esta etapa del procesado de proteínas del plasma, se une a la matriz de tipo heparina o heparina, se activa y posteriormente inactiva el FXIa y la calicreína uniéndose irreversiblemente a ambas proteínas, con lo que elimina de esta forma estas proteínas potencialmente trombogénicas. Por lo tanto, los métodos se podrán aplicar a cualquier disolución que comprenda proteínas del plasma que puede contener serinproteasas activadas siempre que la disolución comprenda también AT III. Sin embargo, también es posible que la heparina o sustancia de tipo heparina se pueda unir directamente a las serinproteasas que contienen sitios de unión a heparina tales como el Factor XI. En tales circunstancias, no es necesario que la fracción de plasma contenga necesariamente AT III y la eliminación de las proteasas activadas como el FXIa se puede lograr en ausencia de AT III.

La AT II es una proteína del plasma y un inhibidor de serinproteasas que inactiva la trombina y las otras serinproteasas responsables de la generación de trombina. La actividad anticoagulante de la heparina o las sustancias de tipo heparina se deriva de su capacidad para potenciar la actividad inhibidora de AT III mediante mecanismos que son similares a la activación fisiológica de la AT III por los proteoglicanos de sulfato de heparán (HSPG) de la pared vascular. La AT III sirve como un importante regulador de la hemostasia y la trombosis a varios niveles bloqueando (a) la formación de coágulo de fibrina mediada por trombina, (b) la generación de trombina mediada por el factor Xa de la vía común y (c) factores de coagulación que se encuentran en puntos superiores de las vías intrínseca y extrínseca (FIXa, FXIa, FXIIa y calicreína del plasma, y FVIIa (Colman *et al.*, *Hemostasis and Thrombosis*, 5.ª edición, 2006 *Lippincott Williams*, pág. 235 f.).

La unión de AT III a heparina o una sustancia de tipo heparina deriva en un cambio conformacional en la AT III que transforma la molécula en un estado altamente activo que posee una actividad inhibidora aumentada varios miles de veces hacia las serinproteasas activadas, como los factores de coagulación activados, mediante la formación de forma irreversible de un enlace covalente con la serinproteasa activada. Tras la formación de este enlace covalente, la serinproteasa pierde de forma irreversible su función biológica como serinproteasa.

La invención es, por lo tanto, un método para reducir la actividad del FXIa en un preparado farmacéutico derivado de una fracción de plasma que comprende antitrombina III, donde la fracción de plasma se ha preadsorbido a una matriz de intercambio aniónico (AEX) y el método comprende poner en contacto la fracción de plasma con heparina, lo que reduce de este modo la actividad de Factor XIa por mL de la fracción de plasma; donde la heparina que se pone en contacto con la fracción de plasma está unida covalentemente a una matriz, donde la matriz de AEX es una membrana de intercambio aniónico.

Una "heparina" en el sentido de la invención es cualquier forma de heparina que cause la activación de la AT III cuando entre en contacto con la AT III, es decir, que la AT III adopta la conformación que tiene una elevada afinidad por la formación de complejos covalentes con serinproteasas activadas, preferencialmente factores de coagulación activados.

Las sustancias de tipo heparina están integradas por un grupo de productos derivados de la heparina, producidos mediante una o más modificaciones químicas. Por ejemplo, la heparina sulfatada es un derivado en el que todos los hidroxilos primarios de los residuos de glucosamina y una gran proporción de los grupos hidroxilo secundarios en las unidades de disacárido se han sustituido con ésteres O-sulfato; la heparina con carboxilo reducido es un derivado en el que los grupos carboxilo de los residuos de ácido urónico de la heparina se han reducido a alcoholes; la heparina oxidada con peryodato es un derivado en el que todos los residuos de ácido urónico no sulfatados de la heparina se oxidan con ácido peryódico. Otros derivados de heparina incluyen, por ejemplo, la heparina O-desulfatada, heparina 2-O-desulfatada, heparina completamente N-acetilada, heparina completamente N-sulfatada, heparina N-desulfatada, heparina N-deacetilada. La expresión "heparina o sustancias de tipo heparina" engloba heparina no fraccionada, heparinas de alto peso molecular, heparinas de bajo peso molecular y análogos sintéticos de la heparina como fondaparinux.

La "heparina o sustancias de tipo heparina" se pueden utilizar poniéndolas en contacto con una fracción de plasma que comprende serinproteasas activadas, preferencialmente factores de coagulación donde la heparina o sustancia de tipo heparina está acoplada covalentemente a una matriz. Aquí, el complejo covalente de la AT III con el factor de coagulación activado permanece unido a la matriz. Esto proporciona la ventaja particular de que las proteasas activadas, junto con la heparina o sustancia de tipo heparina unida covalentemente a una matriz (es decir, resina de afinidad de heparina) se eliminan fácilmente a continuación de la fracción de plasma utilizando métodos tales como la centrifugación o filtración. Como consecuencia, no existen problemas continuados con, por ejemplo, la posibilidad de que haya heparina o sustancias de tipo heparina altamente cargadas presentes en el preparado farmacéutico (tales moléculas, a causa de su naturaleza altamente cargada pueden ser extremadamente difíciles de eliminar en los pasos sucesivos del procesado de fraccionamiento). Un problema adicional que se supera poniendo en contacto la fracción de plasma con heparina o una sustancia de tipo heparina unida covalentemente a una matriz que después se elimina de la fracción de plasma es que evita la posibilidad de que se reintroduzcan serinproteasas activadas de forma inadvertida en la fracción de plasma, en intermedios posteriores o en el preparado farmacéutico

- en sí debido a la disociación del complejo AT III-proteasa activada. Se tiene constancia, por ejemplo, de que la AT III complejada con trombina disociará trombina activa en un periodo de días (por ejemplo, remítase a Danielsson y Björk, *FEBS Letters*, (1980) 119, 2, 241-244). Como alternativa, la heparina o sustancia de tipo heparina se puede añadir a una fracción de plasma en forma de sustancia soluble. A continuación, el complejo covalente de AT III con el factor de coagulación activado precipita o permanece en disolución.
- La expresión “reducir la actividad específica de al menos una serinproteasa activada por mL de la fracción de plasma” se refiere a que el método conduce a una disminución de la actividad de al menos una serinproteasa por volumen de la fracción de plasma que comprende la antitrombina III. La reducción de la actividad puede deberse únicamente a la unión irreversible de la serinproteasa activada a la antitrombina III activada por heparina, cuando la heparina o la sustancia de tipo heparina se añade en disolución, mientras que el contenido de antígeno de la serinproteasa activada no cambia o puede también conducir a una reducción de la cantidad de la serinproteasa activada si la heparina o sustancia de tipo heparina se acopla a una matriz que posteriormente se separa de la fracción de plasma y donde la serinproteasa permanece acoplada covalentemente a la antitrombina III en la matriz.
- Un “evento adverso” es cualquier efecto causado por la administración del preparado farmacéutico causado por serinproteasas activadas y puede comprender trombosis, reacciones cutáneas, broncoespasmos, hipoxia, fuertes escalofríos, taquicardia, dolores de estómago y presión sanguínea elevada.
- Las “proteínas derivadas del plasma” pueden comprender cualquier proteína que se aísla a partir de plasma humano después del paso de precipitación en etanol al 8% de acuerdo con Cohn o un paso equivalente de acuerdo con otros métodos para el fraccionamiento de plasma. En un ejemplo, la expresión “proteínas derivadas del plasma” se refiere a todas las proteínas que se aíslan a partir de plasma humano donde los intermedios de estas se han puesto en contacto con una matriz de AEX. Las “proteínas derivadas del plasma” comprenden, por ejemplo, inmunoglobulinas, albúmina, factor H del complemento, inhibidor de proteinasa alfa-1 y transferrina.
- Una “fracción de plasma” de acuerdo con la invención es cualquier disolución o precipitado redisoluto derivados del plasma, donde al menos una parte de las proteínas proceden del plasma humano.
- El Factor XI es una proteína de coagulación y una serinproteasa producida en el hígado y circula en el plasma en una concentración de aproximadamente 5 µg/mL (30 nM). El FXI consta de dos subunidades idénticas de 80 kDa conectadas por puentes disulfuro. La escisión del FXI por el factor XII activado o la trombina convierte cada subunidad en una forma bicatenaria y genera dos sitios activos por molécula de FXIa (Bagila FA, Seaman FS, Walsh PN. *The apple 1 and 4 domains of factor XI act to synergistically promote the Surface-mediated activation of factor XI by factor XIIa. Blood* 1995; 85:2078). La actividad del FXIa está regulada por plaquetas y por varios inhibidores de proteinasas. El sustrato natural para el FXIa es únicamente el FIX; el único cofactor requerido para esta reacción son iones de calcio.
- La precalicreína es una glicoproteína monocatenaria de 88 kDa producida en el hígado. La concentración plasmática de PK es de 50 µg/mL (550 nM), de la cual aproximadamente el 75% circula en forma de complejo con el cininógeno de alto peso molecular y el resto como PK libre (Hojima Y, Pierce JV, Pisano JJ. *Purification and characterization of multiple forms of human plasma prekallikrein. J. Biol. Chem.* 1985; 260: 400-406). La proteólisis limitada de la PK por el FXIIa genera la serinproteasa calicreína activa (Dela Cadena R, Watchfogl Y, Colman RW. *Hemostasis and Thrombosis*, 3.ª edición, págs. 219-240).
- El factor XII (factor de Hageman) es una glicoproteína monocatenaria de 76 kDa producida en el hígado. En el plasma, el FXII circula como un zimógeno de proteasa en una concentración de aproximadamente 30 µg/mL (400 nM). Tras una lesión vascular, el FXII se une a las superficies extravasculares cargadas negativamente, que facilitan la activación del zimógeno a la serinproteasa activa (Pixley RA, Schapira M, Coleman RW. *The regulation of human factor XIIa by plasma proteinase inhibitors. J. Biol. Chem.* 1985; 260(3): 1723-1729). La actividad del FXIIa en el plasma está regulada predominantemente por el inhibidor de C1.
- Un “intermedio” de un preparado farmacéutico que comprende una o más proteínas del plasma puede ser cualquier fracción intermedia durante la purificación de dichas una o más proteínas del plasma y comprende, por ejemplo, cualquier sobrenadante de un paso de precipitación durante la purificación o cualquier eluato de una matriz utilizada para la purificación de una proteína derivada del plasma.
- El método de la invención es especialmente útil porque la fracción de plasma que se pone en contacto con heparina o una sustancia de tipo heparina se adsorbe primero a una matriz de intercambio aniónico (matriz de AEX). El experto interpelado comprenderá que la adsorción a la matriz de AEX se puede completar en la fracción de plasma en sí o en un intermedio de la fracción de plasma. Un ejemplo de esto sería cuando la matriz de AEX se utiliza para adsorber PT en plasma pobre en crioprecipitado y la fracción de plasma es el sobrenadante de etanol al 8% posterior.
- Una “matriz de intercambio aniónico” (matriz de AEX) se refiere a una fase sólida que está cargada positivamente en el momento de la unión a proteína, que tiene, por tanto, uno o más ligandos cargados positivamente unidos a ella.

Se puede utilizar cualquier ligando cargado positivamente unido a una fase sólida adecuado para formar la matriz de intercambio aniónico, tal como grupos amino cuaternarios. Por ejemplo, un ligando puede ser un amonio cuaternario tal como una alquilamina cuaternaria y una alquilalcanolamina cuaternaria o amina, dietilamina, dietilaminopropilo, amino, trimetilamonio, trimetilbencilamonio, dimetiletanolbencilamonio y poliamina.

- 5 Las matrices de intercambio aniónico que se pueden adquirir de proveedores comerciales, que a menudo se denominan también resinas, incluyen, sin carácter limitante, DEAE celulosa, POROS® PI 20, PI 50, HQ 10, HQ 20, HQ 50, D 50 de Applied Biosystems, MonoQ®, MiniQ, Source™ 15Q y 30Q, Q, DEAE y ANX Sepharose® de flujo rápido, Q Sepharose® de alto rendimiento, QAE SEPHADEX™ y FAST Q SEPHAROSE de GE Healthcare, WP PEI, WP DEAM, WP QUAT de J. T. Baker, Hydrocell DEAE e Hydrocell QA de Biochrom Labs Inc., UNOsphere™ Q, Macro-Prep® DEAE y Macro-Prep® High Q de Biorad, Ceramic HyperD® Q, ceramic HyperD® DEAE, Q HyperZ®, Trisacryl® M y LS DEAE, SpheroDex® LS DEAE, QMA Spherosil® LS, QMA Spherosil® M de Pall Technologies, matriz aniónica DOWEX® de base fuerte de malla fina Tipo I y Tipo II y DOWEX® MONOSPHER E 77, de aniones de base débil de Dow Liquid Separations, Matrex Cellulose A200, A500, Q500 y Q800, de Millipore, Fractogel® EMD TMAE3 Fractogel® EMD DEAE y Fractogel® EMD DMAE de EMD, intercambiadores aniónicos fuertes y débiles de tipo I y II de Amberlite™, intercambiadores aniónicos fuertes y débiles de tipo I y II de DOWEX®, intercambiadores aniónicos fuertes y débiles de tipo I y II de Diaion, Duolite® de Sigma-Aldrich, TSK gel® Q y DEAE 5PW y 5PW-HR, Toyopearl® SuperQ-650S, 650M y 650C3 QAE-550C y 650S, DEAE-650M y 650C de Tosoh y QA52, DE23, DE32, DE51, DE52, DE53, Express-Ion™ D y Express-Ion™ Q de Whatman.

La matriz de AEX también puede ser una membrana de intercambio aniónico. Las membranas de intercambio aniónico que se pueden adquirir de proveedores comerciales incluyen, sin carácter limitante, Sartobind® Q de Sartorius, Mustang® Q de Pall Technologies y la membrana Intercept™ Q de Millipore.

Figuras

Figura 1: Cascada de coagulación.

Figura 2: Representación esquemática de un fraccionamiento de plasma industrial de Cohn/Oncley modificado.

25 **Figura 3:** Representación esquemática de un fraccionamiento de plasma industrial de Kistler/Nitschmann modificado.

Figura 4: Alternativas de procesado para la fabricación en la etapa de la fracción II/III en los esquemas de fraccionamiento de plasma industrial de Cohn/Oncley.

30 **Figura 5:** Resultados analíticos (gráfico de respuesta predicha) para la actividad de serinproteasas relacionadas con la coagulación en función del nivel de eliminación de antitrombina III (AT III), inhibidor de C1-esterasa (C1) o complejo de protrombina (PT) de un preparado farmacéutico, Inmunoglobulina SC. El análisis estadístico de los resultados de prueba se llevó a cabo utilizando el programa informático Cornerstone versión 5.0 (Applied Materials Co.).

35 **Figura 6:** Correlación entre la actividad de tipo calicreína y Ag de precalicreína (a); correlación entre la actividad de tipo Factor XI y Ag de Factor XI (b).

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

Ejemplo 1.1 – Introducción

40 El análisis de los niveles de calicreína y FXIa en múltiples lotes de inmunoglobulina subcutánea sugirió que los niveles superiores se relacionaban con los lotes en los que se había sometido una proporción mayor de la fracción de plasma a la adsorción de PT y C1-INH y solo una pequeña cantidad de la fracción de plasma se había adsorbido a la resina de afinidad de heparina. Mientras que los factores dependientes de vitamina K del sistema de coagulación se adsorben a DEAE-Sefarosa, los factores implicados en el sistema de activación por contacto permanecen en la fracción de la Ig. Se tiene constancia de que estos factores, en concreto el cininógeno de alto peso molecular complejo con precalicreína o FXI y FXII, son activados por superficies cargadas negativamente (McMillin CR, *et al.*: *The secondary structure of human Hageman factor (factor XII) and its alteration by activating agents*. *J. Clin. Invest.* 1974; 54, 1312-22). Sorprendentemente, sin embargo, los análisis de los lotes sugirieron que los materiales cargados positivamente tales como las resinas de intercambio aniónico (p. ej., resinas DEAE & QAE) también podían activar estas serinproteasas. Por tanto, los pasos de preadsorber una fracción de plasma a una matriz de intercambio aniónico (AEX) y de poner en contacto a continuación la fracción de plasma con heparina o una sustancia de tipo heparina, particularmente cuando esta sustancia se puede eliminar posteriormente de la fracción de plasma, proporcionan un medio ideal para garantizar que los preparados farmacéuticos resultantes estén esencialmente exentos de factores de coagulación activados tales como FXIa. Para investigar esto adicionalmente, se llevaron a cabo los siguientes estudios.

55 Se realizó una investigación analítica de una inmunoglobulina para administración subcutánea (inmunoglobulina SC). Se aplicaron varios métodos analíticos en relación con la presencia potencial de cantidades traza de factores

de coagulación activados y actividad proteolítica en la inmunoglobulina SC.

La evaluación de los datos analíticos reveló que los lotes de inmunoglobulina SC contienen niveles de actividad procoagulante en correlación con las variaciones aplicadas del esquema de adsorción. Una comparación de los esquemas de adsorción de los lotes individuales reveló que los niveles superiores de actividad procoagulante se correlacionan con niveles de adsorción de complejo de protrombina (PT) elevados y niveles de adsorción de antitrombina (AT III) bajos durante los pasos del proceso de fraccionamiento de plasma.

Sobre la base del resultado de actividad procoagulante, se adaptó el proceso de producción para que incluyera la máxima adsorción de AT III. Los ejemplos sucesivos proporcionan una evidencia sólida de que un nivel elevado de adsorción de AT III conduce a una disminución significativa de la actividad procoagulante del producto de inmunoglobulina SC.

Ejemplo 1.2 – Proceso de fabricación para una inmunoglobulina SC

La sustancia farmacológica se preparó mediante un fraccionamiento de Cohn modificado (Cohn EJ, Strong LE, *et al.* *Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids.* *J. Am. Chem. Soc.* 1946; 68:459-75). El plasma se descongeló, se separó el crioprecipitado formado y contenía fibrinógeno y complejo de factor de von Willebrand/Factor VIII antihemofílico. Con el sobrenadante, plasma empobrecido en crioprecipitado (también conocido como plasma pobre en crioprecipitado), se podría llevar a cabo, opcionalmente, una adsorción del complejo de protrombina (adsorción de PT) y del inhibidor de C1-esterasa (adsorción de C1) por lotes opcional (remítase a la Figura 4). Posteriormente, se añadió etanol al plasma empobrecido en crioprecipitado o al filtrado procedente de una o varias adsorciones previas para ajustar una concentración de etanol del 8%. El precipitado, Fracción I de Cohn, contenía principalmente fibrinógeno y factor XIII y se separó por filtración. Con el sobrenadante (Fracción I) de etanol al 8% se podría llevar a cabo una adsorción de antitrombina III por lotes opcional.

Se suspendieron de 60 a 100 mL de resina de afinidad de heparina por litro de plasma empobrecido en crioprecipitado con la misma cantidad de sobrenadante de Fracción I en una columna cromatográfica. La suspensión obtenida se añade a la cantidad residual del lote para el fraccionamiento. El valor de pH se ajusta a 6.5 (\pm 0.1) con ácido clorhídrico mientras se agita. El tiempo de agitación total es de 45 a 60 min con una temperatura del producto de 0 (\pm 2) °C. Posteriormente, la disolución del producto se filtra a través de una bolsa de filtro y el filtrado se transfiere para un fraccionamiento de plasma adicional.

El sobrenadante de la Fracción I o la fracción no retenida procedente de la adsorción de AT III previa se precipitó con una concentración de etanol de un 25%. El precipitado resultante, la Fracción II/III de Cohn, se obtuvo por centrifugación y contenía principalmente inmunoglobulinas. La Fracción II/III se congela y almacena a una temperatura de -20 °C o inferior.

Tras disolverla en una disolución de glicina acuosa, la fracción II/III se precipitó adicionalmente con una concentración de un 10% de etanol en presencia de un 0.5% de un alcohol graso (también denominada pre-precipitación al 10% porque precede a la precipitación principal al 20%). El precipitado, que contenía principalmente IgM, IgA y lipoproteínas, se eliminó por filtración.

El sobrenadante se precipitó adicionalmente con una concentración de etanol de un 20%. El precipitado formado que estaba compuesto principalmente por IgG (pasta de gammaglobulina) se obtuvo por filtración. La pasta de gammaglobulina cruda se congeló. Posteriormente, se disolvió y se sometió a adsorción utilizando una resina de intercambio iónico y carbón activado para eliminar la albúmina y el alcohol graso residuales. Las impurezas unidas a la resina y al carbón activado se eliminaron por filtración, respectivamente. El filtrado se estabilizó posteriormente con sacarosa y glicina. La disolución estabilizada se pasteurizó como un paso de reducción de virus eficaz. Una vez que se completó la pasteurización, los estabilizantes se eliminaron por ultrafiltración (diálisis). La disolución se concentró a continuación para obtener la sustancia farmacológica, el ultraconcentrado de inmunoglobulina.

Tras el proceso de combinación de los lotes de ultraconcentrado de inmunoglobulina, se llevó a cabo un ajuste del producto a granel y la disolución a granel ajustada se sometió a continuación a una filtración a través de filtros de cartuchos de clarificación seguida de una filtración esterilizante. Inmediatamente después de completar el proceso de rellenado, los viales se taparon y sellaron automáticamente con tapones a presión.

EJEMPLO 1.2 – MÉTODOS ANALÍTICOS

1.2.1 Actividad de tipo Factor XIa (estrategia del aPTT en plasma empobrecido en FXI)

El tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) es una prueba de coagulación que engloba todos los pasos de la vía intrínseca de coagulación sanguínea desde la activación del sistema de la fase de contacto hasta la formación de fibrina. Durante la fase de preincubación del ensayo del aPTT, el Factor XII fue activado por superficies cargadas negativamente (p. ej., Pathromtin SL) y activó el Factor XI a Factor XIa en presencia de cininógeno de alto peso

molecular. El resultado de este paso inicial fue la producción de FXIa. La fase de medición de coágulo del ensayo del aPTT tuvo lugar después de una recalcificación durante la cual el FXIa activó al FIX, con lo cual, por tanto, continuó la cascada a través de FXa hasta la trombina.

5 Se aplicó plasma deficiente en Factor XI y la presencia de factor XI de coagulación activado en la muestra derivó especialmente en una disminución del tiempo de coagulación. La muestra se consideró “activada” con tiempos de coagulación inferiores provocados por la actividad de tipo FXIa en la muestra. Un tiempo de coagulación más prolongado indicó una actividad procoagulante inferior.

10 El plasma deficiente en Factor XI y el reactivo Pathromtin SL se incubaron durante 6 minutos a +37 °C. El Pathromtin SL es un reactivo compuesto por un fosfolípido y un activador superficial (partículas de dióxido de silicio) utilizado para activar los factores del sistema de coagulación intrínseca. Posteriormente, se añadió una muestra, junto con una disolución de CaCl₂ 25 mM, que desencadena el proceso de coagulación. Se midió el tiempo entre la adición de CaCl₂ y la formación del coágulo. Se utilizó un tampón como muestra de control y como diluyente para la preparación de las muestras de los productos. El tampón utilizado para los experimentos de prueba del FXIa estaba compuesto por un tampón de imidazol adquirido de proveedores comerciales y un 1% de albúmina humana. El material de referencia del Factor XIa se utilizó a efectos de cuantificación y los datos de la prueba se presentaron como la equivalencia de FXIa.

1.2.2 Actividad de tipo caliceína (sustrato cromogénico S-2302)

20 La actividad de tipo caliceína se estimó por medio de la escisión del sustrato cromogénico H-D-Pro-Phe-Arg-pNA (sustrato cromogénico S-2302, Chromogenix Co.) y medición de la absorbancia de pNA a 405 nm. El S-2302 es un sustrato cromogénico que reacciona principalmente con la caliceína del plasma y, por lo tanto, se utiliza para la determinación de la actividad de tipo caliceína.

25 Tras la adición de la disolución de sustrato cromogénico, las muestras se incubaron a +37 °C durante 30 minutos. La caliceína activa en la muestra puede escindir el sustrato de manera dependiente de la concentración. Esto condujo a una diferencia en la absorbancia (densidad óptica) entre el pNA formado y el sustrato original que se midió fotométricamente a 405 nm. Además, la evaluación se llevó a cabo basándose en una curva de calibración aplicando un material de referencia estándar comercial de caliceína.

1.2.3 Actividad proteolítica (sustratos cromogénicos)

30 La determinación colorimétrica de la actividad proteolítica en las muestras se llevó a cabo aplicando sustratos cromogénicos. Tras la adición de la disolución de sustrato cromogénico, las muestras (diluidas por un factor 1:20) se incubaron a +37 °C durante 30 minutos. La actividad proteolítica de la muestra puede escindir el sustrato de manera dependiente de la concentración. El método para la determinación de la actividad se basa en la diferencia en la absorbancia (densidad óptica) entre el pNA formado y el sustrato original. La tasa de formación de pNA, es decir, el incremento en la absorbancia por segundo a 405 nm, es proporcional a la actividad enzimática y se determinó.

35 La siguiente tabla (Tabla 1) proporciona una visión general de los sustratos aplicados en este estudio y la respectiva especificidad.

Tabla 1a: Visión general de los sustratos cromogénicos aplicados

Etiqueta (Cromogenix Co.)	Sustrato cromogénico principalmente para*
S-2302	Actividad de tipo caliceína
S-2366	Proteína C activada, FXIa
S-2238	Trombina
S-2765	FXa
S-2251	Plasmina, plasminógeno activado por estreptocinasa
S-2288	Amplio espectro de serinproteasas, varias proteasas con especificidad por arginina
* según Chromogenix Co., Italia	

1.2.4 ELISA del Factor XI

40 El antígeno del FXI humano en las muestras de inmunoglobulina SC se determinó cuantitativamente utilizando anticuerpos emparejados (ELISA tipo sándwich) que se pueden adquirir de proveedores comerciales, p. ej., suministrados por Coachrom Diagnostika Co. Los pocillos de una placa de microtitulación se recubrieron con anticuerpo policlonal para FXI con el fin de capturar el FXI de la muestra o de la disolución de referencia estándar. Posteriormente, se añadió un anticuerpo para FXI (policlonal) conjugado con peroxidasa de rábano picante a los pocillos de la placa de microtitulación. Tras la eliminación de los anticuerpos no unidos mediante varios pasos de lavado, se añadió una disolución de un sustrato que reacciona con peroxidasa, lo que deriva en una coloración de

manera dependiente de la concentración.

La coloración se formó en proporción a la cantidad de FXI presente en la muestra. Esta reacción se terminó mediante la adición de ácido y se midió fotométricamente a 450 nm utilizando los sistemas BEPII o BEPIII (Siemens Co.). Además, se aplicó una curva de calibración utilizando plasma humano estándar (Siemens Co.).

- 5 El FXI humano se detectó, así como también el FXIa humano, debido a la reactividad cruzada de ambos con los anticuerpos emparejados policlonales aplicados.

1.2.5 ELISA de la precalicreína

10 El antígeno de la precalicreína humana en las muestras de inmunoglobulina SC se determinó cuantitativamente utilizando anticuerpos emparejados (ELISA tipo sándwich) que se pueden adquirir de proveedores comerciales suministrados por Affinity Biologicals Co. Los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con un anticuerpo policlonal para precalicreína con el fin de capturar la precalicreína de la muestra o de la disolución de referencia estándar. Posteriormente, se añadió un anticuerpo para precalicreína (policlonal) conjugado con peroxidasa de rábano picante a los pocillos de la placa de microtitulación. Tras la eliminación de los anticuerpos no unidos mediante varios pasos de lavado, se añadió una disolución de un sustrato que reacciona con peroxidasa, lo que derivó en una coloración de manera dependiente de la concentración.

15 La coloración se formó en proporción a la cantidad de precalicreína presente en la muestra. Esta reacción se terminó mediante la adición de ácido y el color producido se cuantificó mediante una medición fotométrica a 450 nm. Para la determinación se utilizaron los sistemas BEPII o BEPIII (Siemens Co.).

20 La precalicreína humana se detectó, así como también la calicreína humana, debido a la reactividad cruzada de ambas con los anticuerpos emparejados policlonales aplicados.

1.2.6 ELISA del Factor XII

25 El antígeno del FXII humano en las muestras de inmunoglobulina SC se determinó cuantitativamente utilizando anticuerpos emparejados que se pueden adquirir de proveedores comerciales (ELISA tipo sándwich), p. ej., suministrados por Kordia Co. La estrategia de prueba aplicada es comparable con la determinación de FXI y PK mediante la tecnología ELISA según se ha mencionado anteriormente.

1.3 Resultados de las pruebas

30 Se analizó la actividad procoagulante de 29 lotes de producto farmacológico de inmunoglobulina SC fabricados en CSL Behring Marburg (Alemania). Los lotes se seleccionaron basándose en su esquema de adsorción. El porcentaje de la tasa de adsorción por lote de inmunoglobulina SC enunciado es el resultado de mezclar varios lotes intermedios de fracción II/III con diferentes niveles de adsorción.

Por ejemplo, se adsorbió PT de la cantidad total (100%) de pastas de fracción II/III utilizadas para la muestra de inmunoglobulina SC n.º 13, mientras que un 59.8% también se sometió a la adsorción de inhibidor C1-esterasa y un 1.8% a la adsorción de AT III.

35 También se iniciaron análisis y pruebas de las actividades suplementarios de la inmunoglobulina SC en relación con la potencial presencia de cantidades traza de factores de coagulación activados y actividad proteolítica en el producto farmacológico de inmunoglobulina SC. Para la identificación y cuantificación de factores de coagulación residuales se llevaron a cabo varias estrategias complementarias:

- Se midieron las cantidades traza de FXI y FXIa mediante una prueba del apTT modificada llevada a cabo con plasma deficiente en FXI.
- 40 • Se midió la actividad de tipo calicreína aplicando el sustrato cromogénico S-2302 (Chromogenix Co.) debido a que generalmente se supone que son las impurezas principales de los preparados de inmunoglobulina.
- Se investigó la potencial presencia de actividad proteolítica utilizando sustratos cromogénicos que caracterizan una amplia gama de proteasas.
- Se utilizó la tecnología ELISA para la determinación de antígenos de FXI, PK y FXII, respectivamente.

45 Los resultados del producto farmacológico de inmunoglobulina SC investigado mediante la actividad de tipo FXIa, actividad de tipo calicreína y actividad proteolítica se resumen en la Figura 5. El análisis estadístico de los resultados de las pruebas se llevó a cabo utilizando el programa informático Cornerstone versión 5.0 (Applied Materials Co.). La evaluación comprende 29 lotes de inmunoglobulina SC en total.

50

Tabla 1b: Lotes seleccionados de producto farmacológico de inmunoglobulina SC para una evaluación analítica adicional.

N.º de muestra	Esquema de adsorción [%]			Actividad de tipo FXIa equiv. de FXIa [µg/mL]	Actividad de tipo caliceína (S-2302) [µg/mL]
	PT	C1	AT III		
Lotes sin ningún paso de adsorción:					
1	0	0	0	0.06	< 0.8
2				0.03	< 0.8
3				0.18	< 0.8
4				0.08	< 0.8
Lotes con un 100% de adsorción tanto de PT como de AT III, pero diferentes cantidades de material con C1 adsorbido:					
5	100	41.3	100	< 0.01	< 0.8
6		43.4		< 0.01	< 0.8
7		60.5		< 0.01	< 0.8
Lotes con un 100% de adsorción de PT y casi sin ninguna adsorción de AT III, pero diferentes cantidades de material con C1 adsorbido:					
8	100	0	0	14.14	20.0
9		8.8	0	6.56	11.9
10		13.1	0	11.10	15.9
11		30.8	0	12.90	19.5
12		34.8	0	17.96	18.8
13		59.8	1.8	23.98	23.7
Lotes con un 100% de material con PT adsorbida y de un 70 a un 80% de material con C1 adsorbido, pero diferentes cantidades de material con AT III adsorbida:					
14	100	76.4	15.1	14.94	21.6
15		72.3	59.2	3.73	12.3
Lotes adicionales seleccionados aleatoriamente:					
16	41.1	41.1	63.2	0.13	< 0.8
17	4.6	0	86.4	< 0.01	< 0.8
18	77.7	25.0	100	< 0.01	< 0.8
19	86.5	13.5	0.3	2.13	6.0
20	77.4	0	30.3	1.51	3.0

21		6.2	55.0	0.33	5.0
22		3.3	11.9	3.42	9.8
23		26.8	29.6	5.66	11.3
24		14.1	58.4	2.67	7.6
25	100	0.9	1.8	8.11	14.4
26		1.9	4.0	5.40	13.4
27		30.7	40.4	8.19	10.1
28		17.6	22.6	5.57	15.9
29		20.4	10.1	3.71	17.5

Se seleccionó la muestra n.º 13 de inmunoglobulina SC como un lote con un nivel elevado de actividad procoagulante, mientras que la muestra n.º 7 representa un producto farmacológico de inmunoglobulina SC con un nivel bajo de actividad procoagulante según se determinó en las pruebas analíticas. Se compararon ambos lotes y los resultados de las pruebas se muestran en la Tabla 3. Ambos lotes difieren en el proceso de fabricación de la fracción II/III (precipitado al 25%) utilizada como fracción intermedia de partida para el proceso de fabricación adicional del respectivo producto farmacológico de inmunoglobulina SC. Se había adsorbido PT de la cantidad total (100%) de pastas de fracción II/III utilizada para ambos lotes y aproximadamente un 60% había pasado la adsorción de inhibidor de C1-esterasa en ambos casos. Sin embargo, Se había adsorbido AT III de un 100% de la fracción II/III utilizada para la muestra n.º 7, mientras que solo una cantidad insignificante de la fracción II/III que se transformó posteriormente en el lote n.º 13 había superado el paso de adsorción de AT III (1.8%).

Los datos demuestran que el producto farmacológico con una tasa de adsorción de AT III elevada en el proceso (muestra n.º 7) contiene niveles muy bajos de factores de coagulación activados y de actividad proteolítica en el producto farmacológico (remítase a la Tabla 3), en comparación con un producto fabricado con muy poca adsorción de AT III (muestra n.º 13).

El método utilizado para la determinación de la actividad proteolítica en el producto farmacológico de inmunoglobulina SC se llevó a cabo aplicando sustratos cromogénicos (S-2765, S-2238, S-2251 y S-2288) e indicó un efecto significativamente más bajo en el producto farmacológico cuando se llevó a cabo un paso de adsorción de AT III posteriormente. Debido a la reacción relativamente reducida al utilizar el sustrato S-2251, la presencia de plasmina parece ser menos relevante para el producto farmacológico de inmunoglobulina SC. Además, se determinó mayor empobrecimiento en FXI-Ag (factor de 3.2), PK-Ag (factor de 6.6) y FXII-Ag (factor de 1.2) medidos mediante ELISA y se correlacionó con la adsorción de AT III procesada en un nivel elevado. Los datos anteriores fueron avalados por los resultados analíticos de las fracciones intermedias obtenidos antes y después del paso de adsorción de AT III ("sobrenadante de la fracción I antes de la adsorción de AT III" vs. "después del paso de adsorción de AT III") según se presenta en la siguiente tabla, que muestra una disminución significativa en la actividad de tipo FXIa, así como también en el contenido de antígeno de PK, FXI y FXII.

Tabla 2: Comparación de las fracciones intermedias antes y después del paso de adsorción de AT III.

Fracción intermedia	Contenido de AT III [UI/mL]	ELISA del FXI [µg/mL]	Actividad de tipo FXIa [ng/mL]	ELISA del FXII [mUI/mL]	ELISA de la PK [µg/mL]
Sobrenadante de la fracción I antes de la adsorción de AT III	0.7	3.4	295	601	6.3
Después del paso de adsorción de AT III	0.1	0.3	< 10	16	4.5

Tabla 3: Comparación de las muestras de inmunoglobulina SC (7 vs. 13)

<u>Esquema de adsorción</u>	N.º de lote de inmunoglobulina SC	
	7	13
PT [%]	100	100
C1 [%]	60.5	59.8
AT III [%]	100	1.8
<u>Métodos analíticos</u>	< 0.01	23.98
Actividad de tipo FXIa [equiv. de FXIa, µg/mL]		
Actividad de tipo calicreína (S-2302) [µg/mL]	< 0.8	23.7
S-2765 [mOD/min]	0.3	26.8
S-2238 [mOD/min]	0.7	38.2
S-2251 [mOD/min]	0.1	3.9
S-2366 [mOD/min]	0.7	51.7
S-2288 [mOD/min]	1.2	53.2
Ag del Factor XI (ELISA) [µg/mL]	5.9	19.1
Ag de la Precalicreína (ELISA) [µg/mL]	8.2	54.5
Ag del Factor XII (ELISA) [mUI/mL]	29.3	35.7

5 Los resultados de las pruebas revelaron que un nivel elevado de adsorción de AT III conduce a una disminución significativa de la actividad procoagulante del producto farmacológico de inmunoglobulina SC. Para detallar adicionalmente el efecto de la adsorción de AT III se midió el contenido de factores de coagulación específicos en el producto farmacológico mediante ELISA. La sólida correlación entre la actividad de tipo calicreína y el Ag de precalicreína, y la actividad de tipo FXIa y el Ag de FXI se muestra en la Figura 6.

10 El aumento de la adsorción de AT III condujo a un empobrecimiento en FXI, PK y FXII, medidos en forma de antígeno mediante ELISA, así como también a una reducción de la actividad de tipo calicreína y FXIa, según se muestra en la Tabla 2, Tabla 3 y Figura 5.

15 Los análisis revelaron que los lotes de inmunoglobulina SC fabricados con un nivel elevado de adsorción de AT III presentan una actividad procoagulante baja. Estos lotes mostraron concentraciones más bajas de actividad de tipo FXI (en plasma empobrecido en FXI), así como unos valores de actividad de tipo calicreína más bajos (valor del blanco de PKA). La determinación de la actividad proteolítica en un producto farmacológico de inmunoglobulina SC mediante la aplicación de varios sustratos cromogénicos (S-2765, S-2238, S-2251 y S-2288) indicó una actividad proteolítica significativamente más baja en el producto farmacológico cuando el nivel de adsorción de AT III es elevado.

20 El aumento de la adsorción de AT III condujo a un empobrecimiento en FXI, PK y FXII medido en forma de antígeno mediante ELISA, así como también a una reducción de actividad de tipo calicreína y FXIa, según se muestra en la Figura 5.

25 Se mostró una sólida correlación entre tanto el Ag de precalicreína y el Ag de calicreína como el Ag FXI y la actividad de tipo FXIa. Se mostró que la actividad procoagulante detectada en la inmunoglobulina SC está causada principalmente por el contenido de calicreína y FXIa. Los datos generados en este estudio proporcionan una evidencia sólida de que un nivel elevado de adsorción de AT III conduce a una disminución significativa de la actividad procoagulante del producto farmacológico de inmunoglobulina SC.

Ejemplo 2:

Los análisis revelaron que aumentar la adsorción de AT III durante el proceso de las inmunoglobulinas subcutáneas conduce a un empobrecimiento en los antígenos de FXII, precalicreína y FXI, así como a una reducción de la actividad de tipo calicreína y FXIa. Se mostró una sólida correlación tanto entre el antígeno de calicreína como el antígeno de FXI y la actividad de tipo FXIa. El FXIa y la calicreína se identificaron como impurezas relevantes. Con base en el resultado de actividad procoagulante, se adaptó el proceso de producción para incluir una adsorción máxima, esto es, se expone esencialmente un 100% de la fracción de plasma a la resina de afinidad de heparina.

La eliminación de AT III de los intermedios del producto para reducir la activación de factores activados parece en un principio paradójica, ya que se tiene constancia de que la AT III inhibe los factores de coagulación activados. De hecho, la AT III inhibe los factores de coagulación activados en cierta medida. Además, se tiene constancia de que la heparina acelera la actividad de la AT III en un factor de 1000 (Rosenberg RD: *Role of heparin and heparin-like molecules in thrombosis and atherosclerosis. Fed Proc.* 1985; 44(2), 404-9). Por lo tanto, se llevó a cabo el siguiente análisis. En el primer experimento, se midió un producto del que se tenía constancia que contenía actividades tipo calicreína y FXIa mediante NaPPT, actividad de tipo FXIa y mediante la reactividad hacia un sustrato cromogénico (S2302) (actividad de tipo calicreína). A continuación, se trató el producto farmacológico con 2 U/mL de AT III o con 2 U/mL de AT III más 10 U/mL de heparina. Los parámetros de coagulación se determinaron de nuevo (Tabla 4).

Tabla 4: Empobrecimiento en los factores de coagulación activados mediante AT III y AT III/heparina.

Descripción de la muestra	NaPTT (s)	Actividad de tipo FXIa equiv. de FXIa (µg/mL)	Sustrato cromogénico (S-2302) (mOD/min)
Preparado farmacéutico	41	6.11	604
Preparado farmacéutico + AT III (2 U/mL)	120	0.06	29
Preparado farmacéutico + AT III (2 U/mL) + heparina (10 U/mL)	No se formó coágulo	< 0.01	20

Mientras que el producto farmacológico no tratado reveló un NaPTT acortado, 6.11 µg/mL equivalentes de FXIa y una elevada reactividad hacia S2302 (604 mOD/min), la muestra tratada con AT III mostró un NaPTT prolongado por un factor de 3, una concentración de FXIa reducida por un factor de cien y una reactividad menor por un factor de 30 hacia S2302. Cuando se añadió heparina, este efecto inhibitorio fue incluso más intenso. No se formó coágulo durante el NaPTT, el contenido de FXIa fue inferior al límite de detección y la reactividad hacia S2302 se redujo incluso más.

Esas observaciones son comparables con la situación *in vivo*. La concentración fisiológica de AT III contrarresta los factores de coagulación activados hasta un cierto límite y el tiempo de reacción, no obstante, permite la formación del trombo. El tratamiento con heparina desplaza el equilibrio hacia la anticoagulación y la posibilidad de formación del trombo se reduce notablemente. Por lo tanto, se espera que la adsorción de AT III a Fractogel-heparina aumente la capacidad inhibitoria de AT III y garantice que los factores activados se inactiven y se formen complejos inactivos estables. Estos se pueden luego eliminar de la fracción de plasma simplemente eliminando la resina de afinidad de heparina. Esto garantiza que el preparado farmacéutico contendrá esencialmente serinproteasas no activadas y presentará por tanto un perfil de eventos adversos reducidos.

Sin embargo, si no se eliminan los factores de coagulación activados de la fracción de plasma, los pasos de procesamiento adicionales en la elaboración de los preparados de inmunoglobulina subcutánea no conducirán entonces necesariamente a la eliminación de los factores de coagulación activados tales como el FXIa. Por ello, es un requisito que el proceso de fraccionamiento requerido para elaborar el preparado farmacéutico incluya al menos que una de las fracciones de plasma se ponga en contacto con heparina o una sustancia de tipo heparina (p. ej., una resina de afinidad de heparina). Además, el uso de una resina de afinidad de heparina o similar es ventajoso respecto a las formas solubles de heparina o sustancias de tipo heparina, ya que permite que las proteasas se eliminen físicamente de la fracción que contiene la sustancia farmacológica. Por el contrario, la adición de AT III y formas solubles de heparina o sustancias de tipo heparina conducirá probablemente a la formación de complejos, sin embargo, no necesariamente a la eliminación, ya que es posible que dado un tiempo o los pasos de procesamiento posteriores, los complejos proteasa/AT III/heparina se puedan disociar dando como resultado la reintroducción de serinproteasas activadas tales como FXIa. Nuestros datos indican que solamente una eliminación de los complejos sería efectiva, en lugar de una inactivación, y si no se completa este paso de eliminación, existe entonces la posibilidad de que haya presente actividad proteolítica y factor de coagulación XI activado en el producto final.

Además, cabe destacar que cuando no se elimina la AT III de la fracción de plasma mediante un paso de adsorción por lotes de afinidad de heparina, los pasos de fraccionamiento posteriores no obstante sí la eliminan de modo que el producto farmacéutico de inmunoglobulina subcutánea final está esencialmente exento de AT III. Esto proporciona la posibilidad de obtener un preparado farmacéutico que contiene proteasas activadas, pero no AT III y, por tanto, acentúa la posibilidad de eventos adversos en tales productos.

Ejemplo 3:

Este ejemplo proporciona evidencias de que el uso de resinas de afinidad de heparina se puede incorporar a otras fracciones de plasma intermedias que contengan AT III para eliminar serinproteasas activadas contaminantes tales como FXIa.

La eliminación de los factores de coagulación activados se investigó para la fracción intermedia de plasma pobre en crioprecipitado a escala de laboratorio. La resina de afinidad de heparina (0.5 g) se incubó con el plasma pobre en crioprecipitado (19.5 mL) a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación. Posteriormente, la resina se separó de la fracción de plasma mediante centrifugación (Heraeus Co., Multifuge 3SR+ a 1700 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente). Se midieron los niveles de AT III, antígeno del Factor XI total (remítase al método descrito en el apartado 1.2.4 anterior) y actividad de tipo Factor XIa (remítase al método descrito en el apartado 1.2.1 anterior) en el plasma pobre en crioprecipitado antes y después de la exposición a la resina de afinidad de heparina (Tabla 5). La actividad de la AT III fue de aproximadamente 1.1 UI/mL en el plasma pobre en crioprecipitado y esta se redujo a 0.6 UI/mL tras la exposición a la resina de afinidad de heparina. Los niveles de Factor XI (FXI) se redujeron de 5.5 µg/mL a 0.3 µg/mL mientras que los equivalentes de la actividad de tipo Factor XI activado se redujeron de 2.1 µg/mL hasta valores inferiores al límite de detección del ensayo de < 0.01 µg/mL. Estos resultados sugieren que el paso de adsorción a la resina de afinidad de heparina es eficaz para tratar las fracciones de plasma que comprenden AT III tales como el plasma pobre en crioprecipitado.

Tabla 5: Niveles de AT III, antígeno de Factor XI y actividad de tipo FXIa en plasma pobre en crioprecipitado antes y después de la exposición a la resina de afinidad de heparina.

Descripción de la muestra	Contenido de AT III [UI/mL]	Ag de Factor XI (ELISA) [µg/mL]	Actividad de tipo FXIa equiv. de FXIa [µg/mL]
Plasma empobrecido en crioprecipitado antes de la adsorción de AT III	1.1	5.5	2.1
Plasma empobrecido en crioprecipitado después de la adsorción de AT III	0.6	0.3	< 0.01

El estudio reveló proporciones de empobrecimiento de 10.2 µg de antígeno de FXI por UI de AT III adsorbida. El empobrecimiento total fue de aproximadamente 203 µg de antígeno de FXI por gramo de resina.

Además, el estudio sugiere que la resina de afinidad de heparina puede eliminar tanto el FXIa como el FXI. Se tiene constancia de que la molécula de FXI contiene sitios de unión a heparina y presumiblemente esto contribuye a la capacidad de las resinas de afinidad de heparina para eliminar tanto el FXI activado como el no activado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para reducir la actividad de Factor XIa en un preparado farmacéutico derivado de una fracción de plasma que comprende antitrombina III, donde la fracción de plasma se ha preadsorbido a una matriz de intercambio aniónico (AEX) y el método comprende poner en contacto la fracción de plasma con heparina, lo que reduce así la actividad de Factor XIa por mL de la fracción de plasma; donde la heparina que se pone en contacto con la fracción de plasma está unida covalentemente a una matriz, donde la matriz de AEX es una membrana de intercambio aniónico
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el preparado farmacéutico es un preparado de albúmina.

Figura 1: Cascada de coagulación

(a = factor activado; Ca = calcio; PL = fosfolípido)

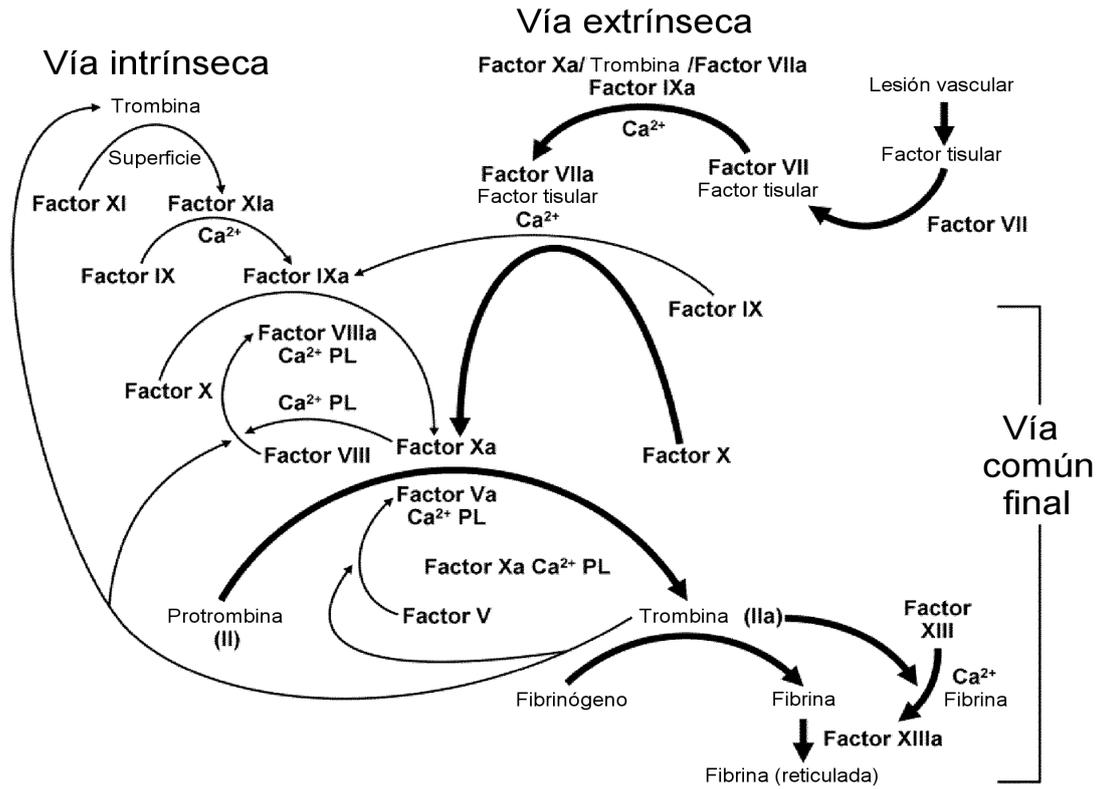


Figura 2: Representación esquemática de un fraccionamiento del plasma industrial de Cohn/Oncley modificado

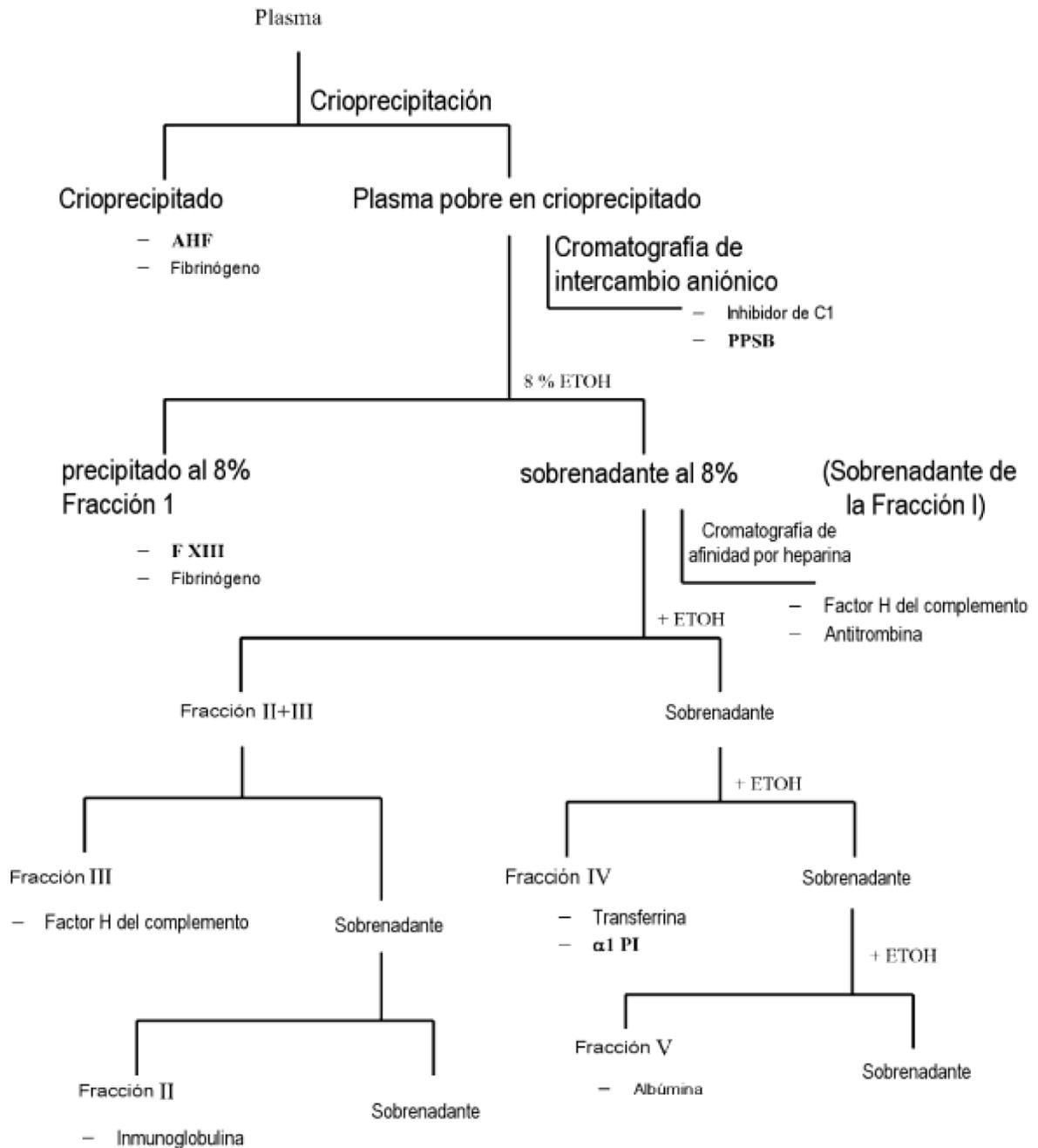


Figura 3:
Representación esquemática de un fraccionamiento del plasma industrial de Kistler/Nitschmann modificado

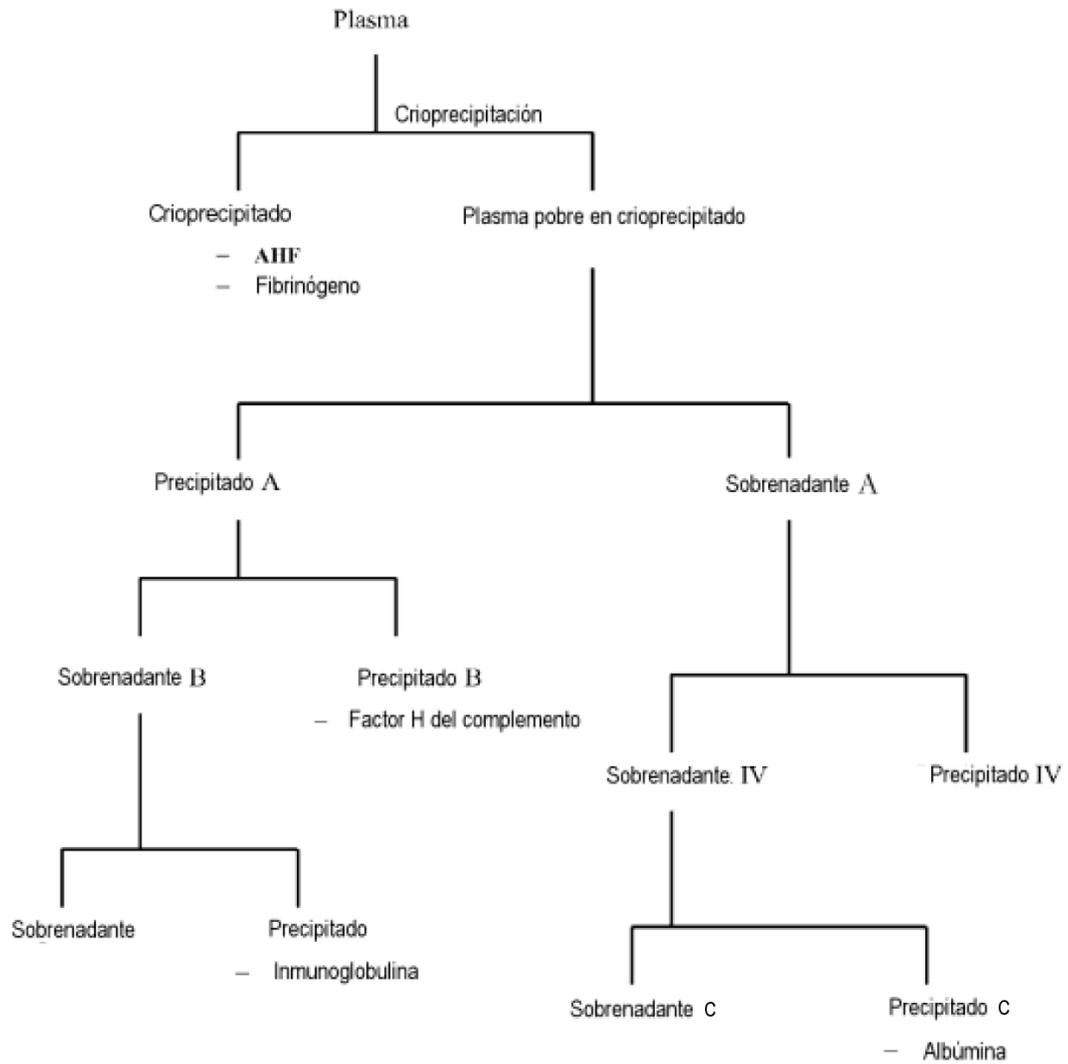
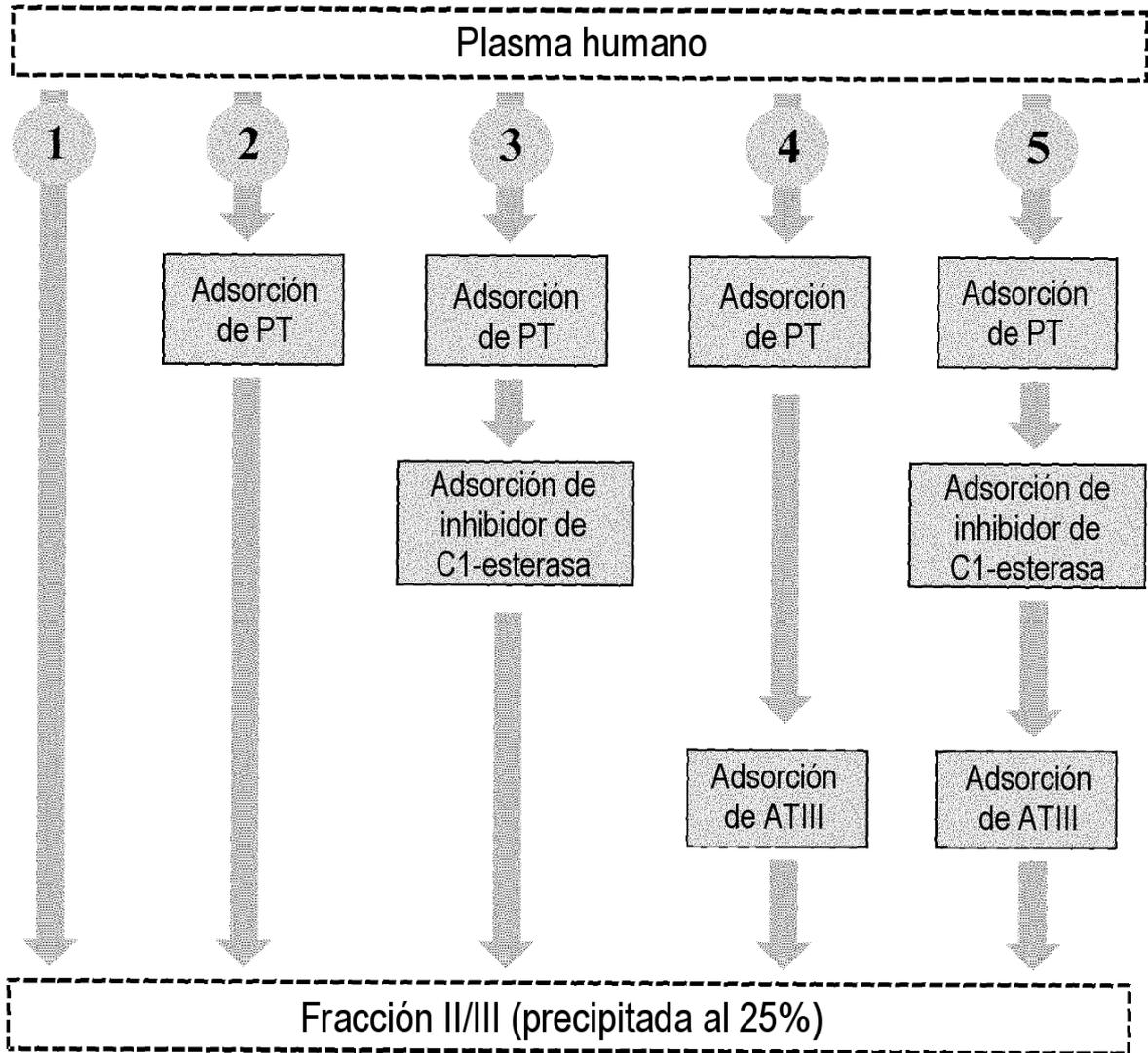


Figura 4:
 Alternativas de procesado para la fabricación de la fracción II/III



- N.º 1: Ningún paso de adsorción realizado
- N.º 2: Solamente el paso de adsorción de PT realizado
- N.º 3: Adsorción de PT seguida de la adsorción de inhibidor de C1-esterasa
- N.º 4: Adsorción de PT seguida de la adsorción de ATIII
- N.º 5: Proceso de adsorción completa (adsorción de PT, inhibidor de C1-esterasa y ATIII)

Figura 5: Resultados analíticos (Gráfico de respuesta predicha)

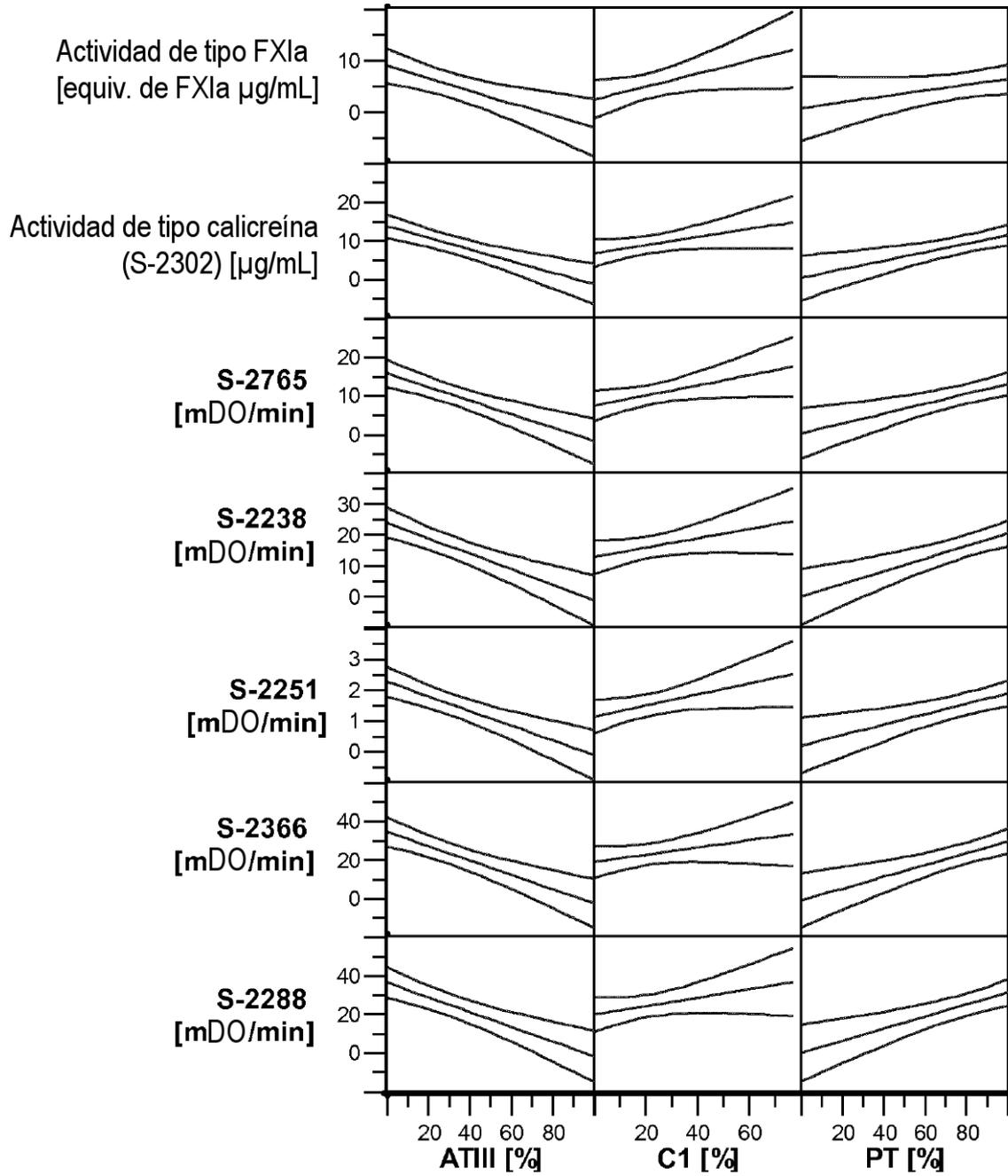


Figura 6: Correlación entre la actividad de tipo caliceína y Ag de precaliceína (a); correlación entre la actividad de tipo Factor XI y Ag de Factor XI (b)

