

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 353**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/14** (2015.01)

**A61P 7/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2012 PCT/EP2012/051873**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2012 WO12104418**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2012 E 12702825 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2670429**

54 Título: **Procedimiento para inactivación/eliminación de factores de coagulación por precipitación**

30 Prioridad:

**04.02.2011 EP 11153349**  
**04.02.2011 US 201161457226 P**  
**19.07.2011 EP 11174559**  
**19.07.2011 US 201161509220 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.07.2018**

73 Titular/es:

**OCTAPHARMA AG (100.0%)**  
**Seidenstrasse 2**  
**8853 Lachen, CH**

72 Inventor/es:

**KAAR, WALTRAUD;**  
**ZÖCHLING, ALFRED y**  
**AHRER, KARIN**

74 Agente/Representante:

**ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María**

**ES 2 675 353 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 para inactivación/eliminación de factores de coagulación por precipitación

5 La presente invención proporciona un procedimiento para inactivación de factores de coagulación presentes en preparaciones de proteínas derivadas de sangre, plasma sanguíneo o por procedimientos recombinantes.

Introducción

10 Como parte de la activación de contacto o la vía intrínseca de la cascada de coagulación los factores de coagulación desempeñan un papel principal en la coagulación de la sangre y la formación de coágulos. Dado que existen evidencias de que algunos factores de coagulación, por ejemplo FXI, pueden activarse durante la fabricación de productos farmacéuticos surge la necesidad de eliminar o al menos inactivar dichos factores de coagulación activados. Es más preferible incluso eliminar tantos factores de coagulación como sea posible de las preparaciones terapéuticas destinadas a aplicación intravenosa o subcutánea con el fin de omitir una formación de coágulos no deseada y peligrosa para la salud en forma de episodios trombóticos en los pacientes.

15 Se conocen procedimientos para la reducción de FXIa o FXI que tienen lugar en solución mezclada con otras proteínas, como las inmunoglobulinas o la albúmina, pero incluyen procedimientos que consumen mucho tiempo basados en cromatografía que representan además inversiones sustanciales cuando se usan resinas de afinidad específica.

20 Bouma y col.; J. Biol. Chem.; 1977; 252(18); 6432-7 enseñan la purificación de FXI que contiene una cantidad no mensurable de FXIa (menos de 0,01 U/ml) a partir de plasma sanguíneo por cuatro etapas cromatográficas sucesivas empezando con cromatografía DEAE seguido por cromatografía QAE y SP y una segunda etapa cromatográfica con SP-Sephadex. En algunas ocasiones se realizó una purificación cromatográfica adicional en gel de afinidad de concanavalina A-Sefarosa para eliminar gammaglobulina (inmunoglobulina G).

25 Komiyama y col.; Thromb. Res.; 1992; 66; 397-408 describen un procedimiento para la eliminación de FXI/FXIa a partir de concentrados de plaquetas con la ayuda de anticuerpos inmovilizados dirigidos frente a FXI.

30 El documento EP-1.816.201-A1 describe la activación de FVII a FVIIa por medio de FXa en un tampón que contiene caprilato de sodio a un pH de 8,5. La proteína FVIIa podría ser inactivada por la adición de citrato de sodio 200 mM y reducción del pH a 5,0.

35 El documento GB-906.860-A divulga la adsorción de factores de coagulación II, VII, IX y X en sulfato de bario insoluble como medio de adsorción. El precipitado obtenido finalmente se elimina y los factores de coagulación se extraen del precipitado empleando un tampón que contiene ácido cítrico.

40 El documento EP-0.987.274-A1 describe la preparación de compuestos que tienen un fuerte efecto antitrombótico a través de la inhibición reversible del factor de coagulación activado VIIa.

45 La descripción de Ganzimmun Diagnostics AG ("Allgemeine Hinweise"; [http://www.ganzimmun.de/item\\_doc/lv/allgemeine\\_hinweise.pdf](http://www.ganzimmun.de/item_doc/lv/allgemeine_hinweise.pdf); recuperado el 07-08-2012) describe un procedimiento para la preparación de heparina-plasma mezclando sangre con heparinato.

50 Steinbuch y col.; Revue Française D'Études Cliniques Et Biologiques, Éditions Médicales Flammarion, París, Fr; 1969; vol. 14; no. 10; 1054-1058; 0370-493 divulga que la precipitación del ácido caprílico puede eliminar IgG, IgA, ceruloplasmina y osmomucoide del plasma humano.

55 Lebing y col.; Vox Sanguinis; 2003; vol. 84; no. 3; 193-201; 0042-9007 divulga una preparación de inmunoglobulinas por medio de precipitación de proteínas no IgG usando caprilato, donde el caprilato es eliminado mediante dos etapas cromatográficas de intercambio de aniones. Lebing y col. especifican además albúmina, IgA, IgM, activador de precalicreína y proteína lipóide. Los factores de coagulación no se mencionan.

En el documento WO-2005/082937-A2 se describe la purificación de IgG a partir de plasma humano usando caprilato o heptanoato.

60 El documento WO-2007/085626-A1 enseña que los adsorbentes basados en silicato son capaces de absorber factor XII en un procedimiento para la purificación de factores derivados del plasma (por ejemplo HGF, PDGF, TGF-α) para

el soporte de la cicatrización de heridas.

Radosevich y col.; Vox Sanguinis; 2010; vol. 98; no. 1; 12-28; 0042-9007 proponen adsorción cromatográfica o precipitación de etanol para eliminar los factores de coagulación de la solución.

5 Williams y col.; J. Allergy Clin. Immunol.; 2013; vol. 131; nº 2; AB10; 0091-6749 evaluaron la eliminación de factores de coagulación durante la fabricación del producto de IGIV Gamunex®-C usando caprilato. Esto ilustra que los expertos en la técnica en 2013 aún consideraban que la inactivación y eliminación completa de los factores de coagulación de los productos de IGIV todavía constituía un problema en el campo.

10 Wolberg y col.; Am. J. Hematol.; 2000; vol. 65; nº 1, 30-3; 0361-8609 comparan los procedimientos para fabricar preparaciones IGIV conocidas en la técnica, y revisados en Radosevich y col. y divulgan que estos procedimientos no son capaces de eliminar completamente los factores de coagulación de las preparaciones de plasma.

#### 15 Resumen de la invención

El objeto de la presente invención es el uso de un ácido orgánico seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido butírico (C4), valérico (C5), caproico (C6), enántico (C7), caprílico (C8), pelargónico (C9) y cáprico (C10) o una sal de los mismos para la inactivación de los factores de coagulación FIXa y/o FXIa activados en soluciones que contienen proteínas obtenidas de sangre, plasma sanguíneo o fracciones plasmáticas, en particular fracciones plasmáticas que contienen como proteínas terapéuticamente activas predominantemente inmunoglobulinas o albúmina, mediante la puesta en contacto de la solución que contiene proteínas con el ácido orgánico o una sal del mismo mientras se agita.

25 Sorprendentemente se encontró que la puesta en contacto de un factor de coagulación que contenía solución de inmunoglobulina G (IgG) con un ácido orgánico o una sal del mismo mientras se agitaba a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 40 °C, en el intervalo de pH de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 6,0, no solo inactivaba FIXa sino también FIXa. El ácido orgánico puede ser un ácido orgánico C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub> saturado o insaturado o sus sales, en particular sales de metales alcalinotérreos como sales de sodio.

30 En una realización de la invención el ácido orgánico es ácido butírico (C4), valérico (C5), caproico (C6), enántico (C7), caprílico (C8), pelargónico (C9) y/o cáprico (C10) o sus sales tales como sales de sodio. En particular, el ácido orgánico es ácido caprílico o su sal de sodio, caprilato de sodio, pero también se encontró que las sales de ácido valérico y ácido cáprico eran adecuadas.

35 Las concentraciones aplicadas del ácido orgánico o una sal del mismo estuvieron dentro del intervalo de 5 a 50 mmol/l. Las proteínas y el ácido orgánico o una sal del mismo se agitaron durante un tiempo de 45 a 180 minutos, en particular de 55 a 120 minutos y el precipitado en desarrollo se separó del sobrenadante. Opcionalmente pueden estar presentes adyuvantes de filtración como silicatos, por ejemplo silicatos de ocurrencia natural o sintetizados seleccionados de entre tierras diatomeas, sílice ahumada, perlitas o zeolitas, durante la agitación. Esta etapa de inactivación es ventajosa ya que puede introducirse en cualquier procedimiento conocido para purificación de las proteínas obtenidas de la sangre cuando parezca apropiado. Las soluciones resultantes de proteínas se manipularon adicionalmente tal como se conoce en la técnica anterior. El uso de ácidos orgánicos de acuerdo con la invención es adecuado en particular para fabricar preparaciones de inmunoglobulina G.

#### 45 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona el uso de un ácido orgánico seleccionado entre el grupo que consiste en ácido butírico (C4), valérico (C5), caproico (C6), enántico (C7), caprílico (C8), pelargónico (C9) y cáprico (C10) o una sal de los mismos para la inactivación de los factores de coagulación FIXa y/o FXIa en soluciones que contienen proteínas. Los ejemplos de dichas soluciones son soluciones de proteínas que contienen predominantemente inmunoglobulinas, en particular inmunoglobulina G (IgG) o albúmina. Con la presente invención pueden evitarse las manipulaciones cromatográficas para la eliminación de factores de coagulación FII, FVII, FVIIa, FIX, FIXa, FX, FXI y FXIa. Naturalmente, pueden emplearse adicionalmente etapas de purificación cromatográfica por otros motivos.

55 Sorprendentemente, se encontró que la puesta en contacto de una solución que contiene una mezcla compleja de factores de coagulación, en particular Fracción I+II+III de fraccionamiento de plasma o fracciones comparables, con un ácido orgánico o una sal del mismo, en particular la sal de sodio, a una temperatura de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 40 °C, en particular de 2° C a 30 °C, y un intervalo de pH amplio de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,0, en particular de 4,2 a 5,6, los factores de coagulación FIXa y/o FXIa inactivados estarán más

allá del límite de detección. Además se observó que los valores de factor XI-antígeno (FXI:Ag) se reducían a menos de 5 mIU/mg de IgG, cuando la solución se ponía en contacto con ácido caprílico o una sal del mismo a una concentración de al menos 20 mmol/l.

5 El valor de pH puede desplazarse dentro de dicho intervalo o puede mantenerse esencialmente constante dentro de este intervalo con una desviación de +/- 0,3 con respecto a un valor fijo durante el tratamiento con el ácido orgánico o una sal del mismo. Las concentraciones aplicadas del ácido orgánico o una sal del mismo, en particular caprilato de sodio, están dentro del intervalo de 5 a 50 mmol/l, en particular de 10 a 22 mmol/l. Se permite que las proteínas y el ácido orgánico o una sal del mismo estén en contacto en agitación constante de 45 a 180 minutos, en particular de 55 a 120 minutos. Durante la agitación puede estar presente un adyuvante de filtración tal como silicatos, por ejemplo silicatos de ocurrencia natural o sintetizados seleccionados de entre tierras diatomeas, sílice ahumada, perlitas o zeolitas; y se elimina conjuntamente con el precipitado en desarrollo después de la puesta en contacto. La separación de precipitado y sobrenadante puede realizarse por procedimientos conocidos en general y puede realizarse por filtración, centrifugación o sedimentación y requiere en general otros 60 a 120 minutos. La separación por sedimentación puede llevar más tiempo. En consecuencia un ciclo de precipitación y separación puede durar hasta 5 horas desde el inicio de la precipitación hasta el final de la separación. En particular, si la primera inactivación puede ser insuficiente para inactivar completamente los factores de coagulación FIXa y/o FXIa. Como pueden producirse cantidades residuales de estos factores por encima del límite de detección, puede ser aconsejable realizar una segunda etapa de inactivación. Los procedimientos para separación de precipitado y sobrenadante son bien conocidos e incorporan sedimentación, filtración o centrifugación o una combinación de los mismos. Una segunda inactivación por el ácido orgánico o una sal del mismo puede incorporarse así como una opción. Esta etapa de inactivación puede introducirse en cualquier procedimiento conocido para la purificación de proteínas obtenidas de la sangre siempre que parezca apropiado. Las soluciones de proteínas resultantes se manipulan adicionalmente tal como se conoce en la técnica anterior. El tratamiento convencional incluye cromatografía de aniones para la eliminación de las cantidades residuales de ácido orgánico o una sal del mismo, tratamiento de solvente/detergente (tratamiento S/D), ultra- y diafiltración, formulación, filtración estéril y llenado en recipientes finales. Como opción, el producto puede someterse también a liofilización. La concentración del producto de IgG final suele estar en el intervalo del 5-16 % de IgG aunque también son posibles concentraciones de hasta aproximadamente el 25 %. Debe mencionarse que las concentraciones superiores al 20 % requieren una formulación específica por motivos de viscosidad cuando se aplican por vía intravenosa. Se descubrió que la recuperación de IgG se beneficiaba del uso de un ácido orgánico o una sal del mismo a bajas temperaturas de aproximadamente 2-8 °C seguido después de la separación del precipitado usando un ácido orgánico diferente o una sal del mismo a temperaturas ambiente de 20-40 °C. Un ejemplo de dicho procedimiento es el tratamiento con caprilato de sodio a 2-8 °C combinado con el tratamiento de la solución después de la separación de precipitado con valerato de sodio o caprato de sodio a 20-40 °C.

#### Procedimientos analíticos

40 Para asegurarse de que durante el procedimiento de fabricación no tuvo lugar una activación o concentración de factores de coagulación, se extrajeron muestras de proceso durante todo el procedimiento y se analizaron en cuanto a los factores de coagulación descritos anteriormente. Se sometieron a ensayo todas muestras de proceso así como los productos en los recipientes finales para verificar la aparición de factores de coagulación. Como muy tarde el segundo tratamiento con ácido orgánico o una sal del mismo en la detección de factores de coagulación no fue posible debido a la eliminación o inactivación. El límite de detección de factores de coagulación no se alcanzó ni se superó incluso en los productos finales concentrados. Por otra parte, la actividad procoagulante de los productos finales se analizó con NATEM y ensayo de generación de trombina (TGA). No se detectó actividad de coagulación en ninguno de los productos finales.

#### Actividad procoagulante

50 La actividad procoagulante se midió en el Analizador de Coagulación ROTEG® disponible en PENTAPHARM® basándose en los principios de la tromboelastografía con la prueba NATEM® y los reactivos star-tem® disponibles en ROTEM® en plasma con deficiencia de factor XI. Todos los ensayos se realizaron con el producto final (concentraciones de IgG del 5 %, el 10 % y el 16 %) y se interrumpieron después de más de 3.000 segundos (50 minutos) sin revelar actividad procoagulante.

#### Ensayo de generación de trombina

60 Los ensayos de generación de trombina (TGA) se realizaron en el TECHNOTHROMBIN® TGA de Technoclone en plasma con deficiencia de factor XI así como en plasma normal en reserva. Se determinaron el tiempo de retardo, es

decir, el inicio de formación de trombina, el máximo de trombina y TTP, es decir, el tiempo para el máximo. Los resultados se resumen en la Tabla 1 que revela tiempos de retardo algo prolongados y TTP en plasma con deficiencia de factor XI (FXI-PD) y una reducción en el máximo de trombina a aproximadamente el 10 % de los valores de reserva de plasma.

5

Tabla 1:

	Reserva de plasma TGA			TGA FXI-DP		
	tiempo de retardo	máximo de trombina	TTP	tiempo de retardo	máximo de trombina	TTP
n=26	[min]	[nM]	[min]	[min]	[nM]	[min]
media	14,9	254,9	23,2	17,5	25,2	32,2
intervalo	11,1-19,1	204-363	19,1-29,1	16,6-27,6	21-31	31,6-45,1

Análisis de los factores FII, FVII, FVIIa, FIX, FIXa, FX, FXI y FXIa

10 Las actividades de coagulación de dichos factores se determinaron en un analizador de coagulación ACL 10000 del Werfen Group con kits de ensayo relevantes con la salvedad de FIXa y FXIa, que se analizaron con el kit de ensayo BIOPHEN® Factor IXa (HYPHEN® BioMed) y una modificación del mismo. La actividad de coagulación de FXIa se midió basándose en el kit de ensayo BIOPHEN® Factor IXa, la adición de FIX recombinante y el calibrado con un concentrado de FXIa. Si bien una curva de calibrado inicial para FIXa solo permitía análisis para un límite de detección inferior de 1,0 mIU/ml, una segunda curva de calibrado ("curva de calibrado de baja concentración") permitía análisis hasta un límite de detección inferior de 0,32 mIU/ml. Por consiguiente, en las tablas de resultados analíticos pueden encontrarse los dos límites. Los resultados se resumieron en las tablas mostradas a continuación. Los valores proporcionados como "<" indican que el límite de detección no se alcanzó, algunos valores medios en la tabla 2 indican un valor inferior al límite de detección que indica que no todos los valores estuvieron por debajo del límite de detección, estos valores medios se calcularon como la suma de la mitad del límite de detección para los resultados "<" y el valor real encontrado para los resultados situados por encima del límite de detección. Alternativamente a dichos valores calculados con la mitad del límite de detección, se realizó un cálculo con el valor del límite de detección como escenario del peor caso posible que reveló 0,015 IU/ml de FVII, 8,4 mIU/ml de FVIIa, 0,016 IU/ml de FIX, 1,12 mIU/ml de FIXa y 1,0 mIU/ml de FXIa.

25 En el caso de que existieran cantidades residuales de FII a concentraciones inferiores al límite de detección de 0,014 IU/ml, debe entenderse que esta cantidad se encuentra dentro del intervalo de 0,001 a 0,014 IU/ml FII. Lo mismo sucede para FVII con un límite de detección de 0,015 IU/ml y un intervalo de 0,001 a 0,015 IU/ml, para FVIIa con un límite de detección de 8,4 mIU/ml y un intervalo de 0,1 a 8,4 mIU/ml, para FIX con un límite de detección de 0,016 IU/ml y un intervalo de 0,001 a 0,016 IU/ml, para FIXa con un límite de detección de 1,12 mIU/ml y un intervalo de 0,01 a 1,12 mIU/ml, para FX con un límite de detección de 0,015 IU/ml y un intervalo de 0,001 a 0,015 IU/ml, para FXI con un límite de detección de 0,014 IU/ml y un intervalo de 0,001 a 0,014 IU/ml. Y también para FXIa, determinado con una curva de calibrado de baja concentración, con un límite de detección de 0,32 mIU/ml y un intervalo de 0,01 a 0,32 mIU/ml, mientras que la curva de calibrado usada inicialmente solo permitía un límite de detección de 1,0 mIU/ml, y en consecuencia, el intervalo es por tanto de 0,01 a 1,00 mIU/ml.

#### EJEMPLOS:

40 Ejemplo 1 (caprilato de sodio): Se disolvió una fracción I+II+III a partir de fraccionamiento de plasma y se enfrió a 2-8 °C y el pH se mantuvo constante en el intervalo de 4,80-4,95 cuando se extrajo la muestra A de esta solución. Se añadió caprilato de sodio a una concentración final de 20 mmol/l y se agitó la solución durante 90 minutos antes del filtrado. Después de extraer la muestra B, se calentó la solución filtrada a 21-27 °C, se mantuvo todavía el pH constante a aproximadamente 4,9 en el intervalo dado y se añadió de nuevo caprilato a una concentración de 20 mmol/l. Después de agitar durante 60 minutos y de centrifugado, se extrajo la muestra C del sobrenadante y se sometieron a ensayo todas las muestras. El sobrenadante se sometió a procesamiento adicional mediante cromatografía de aniones, inactivación de virus (tratamiento S/D), ultra- y diafiltración, formulación, filtración estéril y llenado del producto final.

50 Ejemplo 2: Esencialmente, se realizó el mismo procedimiento que en el ejemplo 1 con la salvedad de que se añadió una cantidad de 10 mmol de caprilato por litro de solución para la segunda precipitación en lugar de ajuste a 20 mmol/l.

Ejemplos 3 y 4: Se realizó el mismo procedimiento que en el ejemplo 2 con las sales de sodio de ácido valérico y ácido cáprico.

TABLA 2: Procedimiento de acuerdo con los ejemplos 1 y 2, donde no se observaron diferencias significativas en las actividades de coagulación. Aunque experimentos posteriores (véanse tablas 4 a 7) revelaron cantidades significativamente más elevadas de factores de coagulación en el material fuente antes de añadir el precipitante el procedimiento de la invención presentado en la presente memoria descriptiva consiguió eliminar estos factores. Incluso en concentrados de IgG al 10 % no se observaron actividades mensurables de factores de coagulación.

5

Factores de coagulación	Muestra A (fracción resusp. I + II + III)		Muestra B (después de 1ª precipitación)		Muestra C (después de 2ª precipitación)	
	Media	Intervalo	Media	Intervalo	Media	Intervalo
<b>FII [IU/ml] (comparativo)</b>	0,30	0,21-0,56	<0,014	<0,014	<0,014	<0,014
<b>FVII [IU/ml] (comparativo)</b>	5,48	3,9-9,5	0,012	<0,015-0,019	<0,015	<0,015
<b>FVIIa [mIU/ml] (comparativo)</b>	1.477,3	1.066-2.108	5,4	<8,4-10,2	<8,4	<8,4
<b>FIX [IU/ml] (comparativo)</b>	3,10	3,10	0,010	<0,016-0,019	<0,016	<0,016
<b>FIXa [mIU/ml]</b>	115,5	55,9-231,0	0,70	<1,12-1,24	<1,12	<1,12
<b>FX [IU/ml] (comparativo)</b>	0,05	0,02-0,12	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015
<b>FXI [IU/ml] (comparativo)</b>	1,31	0,93-1,81	<0,014	<0,014	<0,014	<0,014
<b>FXIa [mU/ml]</b>	113,9	10,9-339,2	1,9	<1,0-3,9	<1,0	<1,0

TABLA 2 (cont.)

Factores de coagulación	Muestra D (concentrado a IgG al 7 %)		Muestra E (recipiente final IgG al 10 %)	
	Media	Intervalo	Media	Intervalo
<b>FII [IU/ml] (comparativo)</b>	<0,014	<0,014	<0,014	<0,014
<b>FVII [IU/ml] (comparativo)</b>	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015
<b>FVIIa [mIU/ml] (comparativo)</b>	<8,4	<8,4	<8,4	<8,4
<b>FIX [IU/ml] (comparativo)</b>	<0,016	<0,016	<0,016	<0,016
<b>FIXa [mIU/ml]</b>	<1,12	<1,12	<1,12	<1,12
<b>FX [IU/ml] (comparativo)</b>	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015
<b>FXI [IU/ml] (comparativo)</b>	<0,014	<0,014	<0,014	<0,014
<b>FXIa [mU/ml]</b>	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0

Tabla 3: Procedimiento de acuerdo con ejemplos 3 y 4:

Factores de coagulación	Muestra A (fracción resusp. I+II+III)		Muestra B (después de 1ª precipitación)		Muestra C (después de 2ª precipitación)	
	Sal de ácido cáprico	Sal de ácido valérico	Sal de ácido cáprico	Sal de ácido valérico	Sal de ácido cáprico	Sal de ácido valérico
<b>FII [IU/ml] (comparativo)</b>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>FVII [IU/ml] (comparativo)</b>	15,5	15,3	1,50	0,19	<0,015	<0,015
<b>FVIIa [mIU/ml] (comparativo)</b>	3.945,0	3.547,0	1.026,00	142,00	<8,4	9,1
<b>FIX [IU/ml] (comparativo)</b>	8,30	7,50	0,36	0,07	<0,016	<0,016
<b>FIXa [mIU/ml]</b>	368,0	358,0	68,00	6,40	<1,12	<1,12
<b>FX [IU/ml] (comparativo)</b>	0,22	0,34	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015
<b>FXIA [IU/ml] (comparativo)</b>	nd	nd	0,32	0,033	<0,014	<0,014
<b>FXIa [mU/ml]</b>	102,0	114,0	20,6	14,7	<1,0	<1,0

ES 2 675 353 T3

TABLA 4: Precipitaciones con valor de pH mantenido constante

Ácido orgánico/sal			caprílico	caprílico		caprílico	caprílico		caprílico	caprílico
Ácido orgánico/sal	[mM]		20	10		20	10		20	20
Valor de pH			4,7	4,7		5,1	5,1		4,5	4,5
Temperatura	[°C]		2	21		2	27		5	25
Agitación	[min]		55	55		90	90		70	70
Muestra		A	B	C	A	B	C	A	B	C
FII (comparativo)	[IU/ml]	0,82	0,017	<0,014	1,15	<0,014	<0,014	0,64	0,02	0,014
FVII (comparativo)	[IU/ml]	5,04	0,023	<0,015	5,05	<0,015	<0,015	4,99	0,05	<0,015
FVIIa (comparativo)	[mIU/ml]	4.090	31	<8,4	4.375	5,5	<8,4	3.604	59	<8,4
FIX (comparativo)	[IU/ml]	4,12	0,09	<0,016	5,20	<0,016	<0,016	2,47	0,059	<0,016
FIXa	[mIU/ml]	293,8	14,2	<1,12	296,7	<1,12	<1,12	280,5	15	<1,12
FX (comparativo)	[IU/ml]	0,27	<0,015	<0,015	0,18	<0,015	<0,015	0,34	0,02	<0,015
FXI (comparativo)	[IU/ml]	3,56	0,11	<0,014	4,24	<0,014	<0,014	3,43	0,17	<0,014
FXIa	[mU/ml]	551	36,7	<0,32	176	1,20	<0,32	226	33	<1,0

TABLA 4 (cont.): Precipitaciones con valor de pH mantenido constante

Ácido orgánico/sal			caprílico	caprílico		caprílico	caprílico		caprílico	caprílico
Ácido orgánico/sal	[mM]		20	10		20	10		20	10
Valor de pH			5,1	5,1		5,1	5,1		5,1	5,1
Temperatura	[°C]		8	27		8	27		2	21
Agitación	[min]		55	90		90	55		55	55
Muestra		A	B	C	A	B	C	A	B	C
FII (comparativo)	[IU/ml]	1,30	<0,014	<0,014	1,23	<0,014	<0,014	1,22	<0,014	<0,014
FVII (comparativo)	[IU/ml]	7,3	<0,015	<0,015	8,6	<0,015	<0,015	8,3	<0,015	<0,015
FVIIa (comparativo)	[mIU/ml]	4.975	<8,4	<8,4	3.645	<8,4	<8,4	4.277	<8,4	<8,4
FIX (comparativo)	[IU/ml]	9,13	<0,016	<0,016	5,55	0,24	<0,016	9,13	<0,016	<0,016
FIXa	[mIU/ml]	327,1	<1,12	<1,12	355,8	<1,12	<1,12	329,6	<1,12	<1,12
FX (comparativo)	[IU/ml]	0,38	<0,015	<0,015	0,25	<0,015	<0,015	0,38	<0,015	<0,015
FXI (comparativo)	[IU/ml]	6,92	<0,014	<0,014	4,42	<0,014	<0,014	6,92	<0,014	<0,014
FXIa	[mU/ml]	296,0	1,3	<0,32	128,2	,83	<0,32	172,5	1,4	<0,32

TABLA 4 (cont.): Precipitaciones con valor de pH mantenido constante

Ácido orgánico/sal			caprílico	caprílico		caprílico	caprílico		caprílico	caprílico
Ácido orgánico/sal	[mM]		20	10		20	10		20	10
Valor de pH			4,7	4,7		4,7	4,7		4,7	4,7
Temperatura	[°C]		8	27		8	21		8	21

ES 2 675 353 T3

Agitación	[min]		55	55		90	55		55	90
Muestra		A	B	C	A	B	C	A	B	C
<b>FII (comparativo)</b>	[IU/ml]	0,72	<0,014	<0,014	0,46	<0,014	<0,014	0,7	<0,014	<0,014
<b>FVII (comparativo)</b>	[IU/ml]	6,18	0,05	<0,015	5,80	<0,015	<0,015	5,48	<0,015	<0,015
<b>FVIIa (comparativo)</b>	[mIU/ml]	3.736	23,1	<8,4	3.990	8,7	<8,4	3.821	<8,4	<8,4
<b>FIX (comparativo)</b>	[IU/ml]	5,02	0,86	<0,016	4,66	0,026	<0,016	6,00	0,02	<0,016
<b>FIXa</b>	[mIU/ml]	292,6	6,59	<1,12	292,4	2,86	<1,12	233,2	1,76	<1,12
<b>FX (comparativo)</b>	[IU/ml]	0,26	<0,015	<0,015	0,24	<0,015	<0,015	0,29	<0,015	<0,015
<b>FXI (comparativo)</b>	[IU/ml]	4,85	0,096	<0,014	4,89	0,035	<0,014	5,32	0,03	<0,014
<b>FXIa</b>	[mU/ml]	332,4	16,6	<0,32	293,1	6,8	<0,32	232,2	4,6	<0,32

TABLA 4 (cont.): Precipitaciones con valor de pH mantenido constante

Ácido orgánico/sal			caprílico	caprílico		caprílico	caprílico		caprílico	caprílico
Ácido orgánico/sal	[mM]		20	10		20	10		20	10
Valor de pH			4,7	4,7		4,7	4,7		4,7	4,7
Temperatura	[°C]		2	27		2	27		2	21
Agitación	[min]		90	55		55	90		90	90
Muestra		A	B	C	A	B	C	A	B	C
<b>FII (comparativo)</b>	[IU/ml]	0,75	<0,014	<0,014	0,68	<0,014	<0,014	0,8	<0,014	<0,014
<b>FVII (comparativo)</b>	[IU/ml]	5,37	0,02	<0,015	6,41	0,03	<0,015	6,26	<0,015	<0,015
<b>FVIIa (comparativo)</b>	[mIU/ml]	4.507	11,9	<8,4	4.197	27	<8,4	4.212	8,8	<8,4
<b>FIX (comparativo)</b>	[IU/ml]	6,72	0,051	<0,016	6,20	0,099	<0,016	5,66	0,029	<0,016
<b>FIXa</b>	[mIU/ml]	289,0	3,43	<1,12	256,9	6,58	<1,12	263,2	2,17	<1,12
<b>FX (comparativo)</b>	[IU/ml]	0,27	<0,015	<0,015	0,32	<0,015	<0,015	0,34	<0,015	<0,015
<b>FXI</b>	[IU/ml]	7,31	0,05	<0,014	6,76	0,11	<0,014	5,46	0,033	<0,014
<b>FXIa</b>	[mU/ml]	371,8	8,9	<0,32	451,1	36,2	<0,32	413,3	16	<0,32

TABLA 4 (cont.): Precipitaciones con valor de pH mantenido constante

Ácido orgánico/sal			caprílico	caprílico		caprílico	caprílico		caprílico	caprílico
Ácido orgánico/sal	[mM]		20	10		20	20		20	10
Valor de pH			4,9	4,9		4,9	4,9		4,9	4,9
Temperatura	[°C]		8	24		5	27		5	24
Agitación	[min]		70	70		70	70		90	70
Muestra		A	B	C	A	B	C	A	B	C
<b>FII (comparativo)</b>	[IU/ml]	1,32	<0,014	<0,014	1,2	<0,014	<0,014	1,51	<0,014	<0,014
<b>FVII (comparativo)</b>	[IU/ml]	6,77	<0,015	<0,015	6,37	0,02	<0,015	7,09	0,02	<0,015
<b>FVIIa (comparativo)</b>	[mIU/ml]	4.240	<8,4	<8,4	4.067	11	<8,4	5.693	<8,4	<8,4
<b>FIX (comparativo)</b>	[IU/ml]	5,95	<0,016	<0,016	5,78	0,026	<0,016	7,99	0,029	<0,016
<b>FIXa</b>	[mIU/ml]	219,4	1,75	<1,12	272,1	2,05	<1,12	397,1	2,12	<1,12

<b>FX (comparativo)</b>	[IU/ml]	0,70	<0,015	<0,015	0,64	<0,015	<0,015	0,65	<0,015	<0,015
<b>FXI (comparativo)</b>	[IU/ml]	4,72	0,017	<0,014	5,02	0,032	<0,014	6,95	0,033	<0,014
<b>FXIa</b>	[mU/ml]	234	5,1	<0,32	243	9,7	<0,32	217	8,2	<0,32

TABLA 4 (cont.): Precipitaciones con valor de pH mantenido constante

<b>Ácido orgánico/sal</b>			caprílico	caprílico		caprílico	caprílico
<b>Ácido orgánico/sal</b>	[mM]		20	10		20	10
<b>Valor de pH</b>			4,9	4,9		4,9	4,9
<b>Temperatura</b>	[°C]		5	24		5	24
<b>Agitación</b>	[min]		70	90		120	70
<b>Muestra</b>		A	B	C	A	B	C
<b>FII (comparativo)</b>	[IU/ml]	1,20	<0,014	<0,014	1,10	<0,014	<0,014
<b>FVII (comparativo)</b>	[IU/ml]	5,50	<0,015	<0,015	5,78	<0,015	<0,015
<b>FVIIa (comparativo)</b>	[mIU/ml]	4.093	<8,4	<8,4	3.888	<8,4	<8,4
<b>FIX (comparativo)</b>	[IU/ml]	6,36	0,022	<0,016	4,67	<0,016	<0,016
<b>FIXa</b>	[mIU/ml]	365,6	2,07	<1,12	281,0	<1,12	<1,12
<b>FX (comparativo)</b>	[IU/ml]	0,49	<0,015	<0,015	0,48	<0,015	<0,015
<b>FXI (comparativo)</b>	[IU/ml]	5,50	0,027	<0,014	2,82	<0,014	<0,014
<b>FXIa</b>	[mU/ml]	144	8,0	<0,32	106	3,90	<0,32

TABLA 5: Precipitaciones con valores de pH crecientes

<b>Ácido orgánico/sal</b>			caprílico	caprílico		caprílico	caprílico		caprílico	caprílico
<b>Ácido orgánico/sal</b>	[mM]		20	10		20	10		20	10
<b>Valor de pH</b>			4,7	5,1		4,7	5,1		4,7	5,1
<b>Temperatura</b>	[°C]		8	27		8	21		2	27
<b>Agitación</b>	[min]		90	90		55	55		15	55
<b>Muestra</b>		A	B	C	A	B	C	A	B	C
<b>FII (comparativo)</b>	[IU/ml]	0,51	0,015	<0,014	0,4	<0,014	<0,014	0,58	<0,014	<0,014
<b>FVII (comparativo)</b>	[IU/ml]	4,55	0,019	<0,015	4,40	<0,015	<0,015	5,70	0,018	<0,015
<b>FVIIa (comparativo)</b>	[mIU/ml]	3.945	27	<8,4	3.384	<8,4	<8,4	3.625	9,9	<8,4
<b>FIX (comparativo)</b>	[IU/ml]	3,38	0,08	<0,016	3,90	0,06	<0,016	4,60	0,08	<0,016
<b>FIXa</b>	[mIU/ml]	269,3	12	<1,12	215,7	3,04	<1,12	273,0	4,62	<1,12
<b>FX (comparativo)</b>	[IU/ml]	0,19	<0,015	<0,015	0,20	<0,015	<0,015	0,19	<0,015	<0,015
<b>FXI (comparativo)</b>	[IU/ml]	3,38	0,08	<0,014	4,91	0,10	<0,014	6,16	0,13	<0,014
<b>FXIa</b>	[mU/ml]	524	39,0	<0,32	362	18,90	<0,32	336	13,5	<0,32

TABLA 5 (cont.): Precipitaciones con valores de pH crecientes

Ácido orgánico/sal			caprílico	caprílico		caprílico	caprílico		caprílico	caprílico
Ácido orgánico/sal	[mM]		20	10		20	10		20	10
Valor de pH			4,7	5,1		4,7	5,1		4,9	5,1
Temperatura	[°C]		2	21		2	21		5	24
Agitación	[min]		90	55		55	90		70	70
Muestra		A	B	C	A	B	C	A	B	C
FII (comparativo)	[IU/ml]	0,56	<0,014	<0,014	0,5	<0,014	<0,014	1,20	<0,014	<0,014
FVII (comparativo)	[IU/ml]	5,30	0,027	<0,015	4,20	<0,015	<0,015	6,23	0,02	<0,015
FVIIa (comparativo)	[mIU/ml]	3.529	19,2	<8,4	3.374	10,2	<8,4	7.395	13,4	<8,4
FIX (comparativo)	[IU/ml]	4,90	0,16	<0,016	4,40	0,08	<0,016	8,62	0,046	<0,016
FIXa	[mIU/ml]	270,6	7,85	<1,12	261,1	4,8	<1,12	320,0	2,11	<1,12
FX (comparativo)	[IU/ml]	0,30	<0,015	<0,015	0,20	<0,015	<0,015	0,32	<0,015	<0,015
FXI (comparativo)	[IU/ml]	6,71	0,23	<0,014	5,70	0,11	<0,014	7,63	0,039	<0,014
FXIa	[mU/ml]	346	26,8	<0,32	291	18,1	<0,32	266,2	8,8	<0,32

TABLA 6: Precipitaciones con valores de pH decrecientes

Ácido orgánico/sal			caprílico	caprílico		caprílico	caprílico		caprílico	caprílico
Ácido orgánico/sal	[mM]		20	10		20	10		20	10
Valor de pH			5,1	4,7		5,1	4,9		5,1	4,7
Temperatura	[°C]		8	27		5	24		2	27
Agitación	[min]		90	90		70	70		55	55
Muestra		A	B	C	A	B	C	A	B	C
FII (comparativo)	[IU/ml]	1,20	0,014	<0,014	1,28	<0,014	<0,014	0,87	<0,014	<0,014
FVII (comparativo)	[IU/ml]	4,92	<0,015	<0,015	7,49	<0,015	<0,015	8,2	<0,015	<0,015
FVIIa (comparativo)	[mIU/ml]	4.240	<8,4	<8,4	5.040	<8,4	<8,4	4.667	<8,4	<8,4
FIX (comparativo)	[IU/ml]	5,84	<0,016	<0,016	11,47	<0,016	<0,016	7,11	<0,016	<0,016
FIXa	[mIU/ml]	317,7	<1,12	<1,12	340,3	<1,12	<1,12	304,8	<1,12	<1,12
FX (comparativo)	[IU/ml]	0,21	<0,015	<0,015	0,32	<0,015	<0,015	0,17	<0,015	<0,015
FXI (comparativo)	[IU/ml]	4,72	<0,014	<0,014	7,97	<0,014	<0,014	5,25	<0,014	<0,014
FXIa	[mU/ml]	221	0,45	<0,32	175,1	2,2	<0,32	183,0	1,0	<0,32

TABLA 6 (cont.): Precipitaciones con valores de pH decrecientes

Ácido orgánico/sal			caprílico	caprílico		caprílico	caprílico
Ácido orgánico/sal	[mM]		20	10		20	10
Valor de pH			5,1	4,7		5,1	4,7
Temperatura	[°C]		2	21		2	21
Agitación	[min]		90	55		55	90
Muestra			A	B		A	B

<b>FII (comparativo)</b>	[IU/ml]	0,98	<0,014	<0,014	0,92	<0,014	<0,014
<b>FVII (comparativo)</b>	[IU/ml]	7,20	<0,015	<0,015	7,00	<0,015	<0,015
<b>FVIIa (comparativo)</b>	[mIU/ml]	4.263	<8,4	<8,4	4.195	<8,4	<8,4
<b>FIX (comparativo)</b>	[IU/ml]	8,98	<0,016	<0,016	7,86	<0,016	<0,016
<b>FIXa</b>	[mIU/ml]	294,8	<1,12	<1,12	314,3	<1,12	<1,12
<b>FX (comparativo)</b>	[IU/ml]	0,13	<0,015	<0,015	0,18	<0,015	<0,015
<b>FXI (comparativo)</b>	[IU/ml]	2,46	<0,014	<0,014	6,78	<0,014	<0,014
<b>FXIa</b>	[mU/ml]	189,0	0,7	<0,32	153,0	0,6	<0,32

TABLA 7: Precipitaciones con ácido cáprico/sal

Ácido orgánico/sal			capríco	capríco		capríco	capríco
Ácido orgánico/sal	[mM]		20	10		20	10
Valor de pH			4,9	4,9		5,2	5,2
Temperatura	[°C]		5	25		5	25
Agitación	[min]		60	60		60	60
<b>Muestra</b>		A	B	C	A	B	C
<b>FII (comparativo)</b>	[IU/ml]	nd	nd	nd	0,4	<0,014	<0,014
<b>FVII (comparativo)</b>	[IU/ml]	15,5	1,7	<0,015	4,3	0,32	<0,015
<b>FVIIa (comparativo)</b>	[mIU/ml]	3.945	1.228	<8,4	2.805	173	<8,4
<b>FIX (comparativo)</b>	[IU/ml]	8,3	nd	<0,016	3,2	0,084	<0,016
<b>FIXa</b>	[mIU/ml]	368	90	<1,12	150	7,31	<1,12
<b>FX (comparativo)</b>	[IU/ml]	0,22	0,015	<0,015	0,05	<0,015	<0,015
<b>FXI (comparativo)</b>	[IU/ml]	nd	0,41	<0,014	1,95	<0,014	<0,014
<b>FXIa</b>	[mU/ml]	102	22,4	<1,0	107,9	3	<1,0

TABLA 8: Precipitaciones con ácido caprílico realizadas con el mismo material de partida; influencia de los valores de pH y las concentraciones

Ácido orgánico/sal		caprílico								
Ácido orgánico/sal	[mM]	10	30	40	10	30	40	10	30	40
Valor de pH		5,5	5,5	5,5	5,0	5,0	5,0	4,7	4,7	4,7
<b>Muestra</b>		B	B	B	B	B	B	B	B	B
<b>FII (comparativo)</b>	[IU/ml]	<0,014	<0,014	<0,014	<0,014	<0,014	<0,014	0,024	<0,014	<0,014
<b>FVII (comparativo)</b>	[IU/ml]	0,073	<0,015	<0,015	0,062	<0,015	<0,015	0,13	<0,015	<0,015
<b>FVIIa (comparativo)</b>	[mIU/ml]	21	<8,4	<8,4	26	<8,4	<8,4	90	13	<8,4
<b>FIX (comparativo)</b>	[IU/ml]	<0,016	<0,016	<0,016	0,066	<0,016	<0,016	0,249	0,04	<0,016
<b>FIXa</b>	[mIU/ml]	<1,12	<1,12	<1,12	2,68	<1,12	<1,12	18,75	5,09	<1,12
<b>FX (comparativo)</b>	[IU/ml]	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015	0,022	<0,015	<0,015
<b>FXI (comparativo)</b>	[IU/ml]	<0,014	<0,014	<0,014	0,055	<0,014	<0,014	0,448	0,072	<0,014
<b>FXIa</b>	[mU/ml]	2,8	2,0	1,8	6,1	1,3	1,3	44,9	30,5	2,4

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un ácido orgánico seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido butírico (C4), valérico (C5), caproico (C6), enántico (C7), caprílico (C8), pelargónico (C9) y cáprico (C10) o una sal de los mismos para la inactivación de factores de coagulación FIXa y/o FXIa en soluciones que contienen proteínas obtenidas a partir de sangre, plasma sanguíneo, fracciones plasmáticas o por medios recombinantes por la puesta en contacto de la solución que contiene proteínas con el ácido orgánico o una sal del mismo mientras se agita.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde el ácido orgánico es un ácido orgánico C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>, saturado o insaturado o sus sales.
3. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde el ácido orgánico es ácido caprílico o ácido cáprico o una sal de estos ácidos.
- 15 4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la solución se pone en contacto con un ácido orgánico o una sal del mismo a una temperatura de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 °C.
- 20 5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la solución se pone primero en contacto con un ácido orgánico o una sal del mismo a una temperatura de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 °C y en segundo lugar se pone en contacto con el mismo ácido o una sal del mismo o un ácido diferente o una sal del mismo a una temperatura de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 °C.
- 25 6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la puesta en contacto tiene lugar en un intervalo de pH de 4,0 a 6,0.
7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 donde la puesta en contacto tiene lugar en un intervalo de pH de 4,2 a 5,6.
- 30 8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde el ácido orgánico o una sal del mismo se añade a la solución que contiene proteínas a una concentración de 5 a 50 mmol/l.
- 35 9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde el ácido orgánico o una sal del mismo se añade a la solución que contiene proteínas a una concentración de 10 a 22 mmol/l.
10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde el ácido orgánico o una sal del mismo que contiene solución de proteínas se agita durante 45 a 180 minutos.
- 40 11. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde el ácido orgánico o una sal del mismo que contiene solución de proteínas se agita durante 55 a 120 minutos.
12. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde el ácido orgánico o una sal del mismo que contiene solución de proteínas se agita en presencia de silicatos de ocurrencia natural o sintetizados.
- 45 13. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 donde se produce un sobrenadante a partir del ácido orgánico o una sal del mismo que contiene solución de proteínas después de agitar por procedimientos de separación seleccionados de entre filtración, sedimentación o centrifugación.
- 50 14. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 donde además de una cromatografía de intercambio de aniones, se realiza un tratamiento S/D, nanofiltración, ultrafiltración, diafiltración, formulación, filtración estéril, llenado en recipientes finales y opcionalmente liofilización.