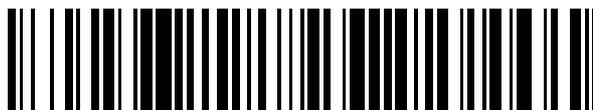


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 455**

51 Int. Cl.:

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2013 PCT/AU2013/001414**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014 WO14085861**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2013 E 13861334 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2928905**

54 Título: **Un método de purificación de proteínas terapéuticas**

30 Prioridad:

05.12.2012 US 201261733761 P

04.02.2013 EP 13153898

14.03.2013 US 201313803740

10.04.2013 AU 2013203357

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

03.05.2019

73 Titular/es:

CSL BEHRING GMBH (100.0%)

Emil-von-Behring-Strasse 76

35041 Marburg, DE

72 Inventor/es:

PHAM, HUNG;

HEY, JEFFREY, MICHAEL y

NGUY, DARREN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 711 455 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

Un método de purificación de proteínas terapéuticas

5 Campo técnico

La presente invención se refiere en general a un método de reducción del nivel de impurezas en una disolución que contiene al menos una proteína terapéutica. Más específicamente, a un método de reducción del nivel de plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular en una materia prima que comprende fibrinógeno.

10

Antecedentes

Los métodos actuales de purificación de una proteína terapéutica que se produce de manera natural o recombinante a partir de una disolución que comprende dicha proteína llevan habitualmente al menos algo de impurezas a la preparación final. En algunos casos, la presencia de impurezas, tales como proteasas, desestabilizará la proteína terapéutica en disolución, particularmente durante su almacenamiento. Por este motivo, muchas proteínas terapéuticas se almacenan como preparaciones liofilizadas o congeladas.

15

20

Aunque los niveles desestabilizantes de impurezas pueden afectar a muchos tipos de proteínas terapéuticas diferentes, son particularmente relevantes para las usadas para mantener la hemostasia. La hemostasia es un proceso fisiológico importante que impide el sangrado tras un daño (por ejemplo, una rotura) de vasos sanguíneos. Existen tres mecanismos básicos que promueven la hemostasia: (i) la vasoconstricción, (ii) la agregación plaquetaria en el sitio de rotura; y (iii) la coagulación. Durante la coagulación, las células endoteliales dañadas liberan factor tisular (factor III), que a su vez activa el factor VII con la ayuda de Ca^{2+} . El factor XII, que se libera por plaquetas activadas, activa el factor XI. El factor VII y el factor XI activados promueven una cascada de reacciones enzimáticas que conducen a la activación del factor X. El factor X activo (factor Xa), junto con el factor III, el factor V, Ca^{2+} y el factor tromboplastico plaquetario (PF_3), activan el activador de protrombina. El activador de protrombina convierte la protrombina en trombina, que convierte el fibrinógeno (factor I) en fibrina, que forma una malla inicial sobre el sitio del daño. La malla inicial se convierte entonces en un coágulo de fibrina denso mediante el factor XIII, sellando la rotura hasta que se repara el sitio. Durante la cascada de coagulación, la trombina también activará el factor VIII, un pro-cofactor de glicoproteína que en la circulación está principalmente complejoado con el factor de von Willebrand (VWF). El factor VIII interacciona con el factor IXa para activar el factor X en presencia de Ca^{+2} y fosfolípidos.

25

30

35

Una deficiencia en el nivel de una cualquiera o más de las proteínas implicadas en la coagulación, incluyendo fibrinógeno, factor VIII y/o factor de von Willebrand (VWF), ya sea congénita o adquirida, puede conducir a una coagulación insuficiente de la sangre y al riesgo de hemorragia. Las opciones de tratamiento actuales se limitan a la administración de una preparación farmacéutica de una o más proteínas terapéuticas, con vistas a restaurar los niveles endógenos de dichas proteínas y mantener la hemostasia. Sin embargo, las preparaciones farmacéuticas existentes, que se derivan normalmente de plasma sanguíneo donado o una fuente recombinante, comprenden zimógenos y proteasas (por ejemplo, protrombina, plasminógeno, activador de plasminógeno tisular (tPA) y/u otras proteasas), que pueden desestabilizar las proteínas terapéuticas, tales como fibrinógeno, factor VIII o VWF durante su almacenamiento. En consecuencia, tales preparaciones son relativamente inestables en disolución acuosa, con un almacenamiento a largo plazo limitado a preparaciones liofilizadas o congeladas.

40

45

Para aplicaciones clínicas, el fibrinógeno se purifica normalmente a partir de plasma humano, en el que representa solo aproximadamente el 2-5% (1,5 - 4,0 g/l) de las proteínas plasmáticas totales. Tradicionalmente, la purificación de fibrinógeno a partir de plasma se lleva a cabo mediante fraccionamiento de plasma clásico, en el que el fibrinógeno se crioprecipita del plasma seguido de precipitación con o bien etanol, o bien sulfato de amonio, o bien β -alanina/glicina, o bien polímeros (por ejemplo, polietilenglicol) o bien disoluciones de fuerza iónica baja. Tales métodos pueden conseguir un rendimiento y homogeneidad relativamente altos. Cuando se requiere un nivel de pureza mayor, a menudo se emplean técnicas cromatográficas. Sin embargo, las técnicas de precipitación y cromatográficas existentes susceptibles de procesos de fabricación a escala comercial producen normalmente preparaciones de fibrinógeno que comprenden proteínas contaminantes, tales como zimógenos o proteasas (por ejemplo, protrombina, activador de plasminógeno tisular (tPA) y plasminógeno), que pueden desestabilizar el fibrinógeno en disolución. Por ejemplo, cuando está presente protrombina, puede activarse para dar serina proteasa trombina, que convertirá a su vez el fibrinógeno en fibrina. De manera similar, cuando están presentes tanto tPA como plasminógeno, el tPA puede activar el plasminógeno a su forma activa plasmina, que hidrolizará a su vez el fibrinógeno para dar fibrina. En consecuencia, las preparaciones de fibrinógeno son relativamente inestables en disolución acuosa, con un almacenamiento a largo plazo limitado a preparaciones liofilizadas o congeladas.

50

55

60

Contaminantes específicos pueden eliminarse mediante absorción; por ejemplo, la fibronectina en gelatina inmovilizada y plasminógeno en lisina inmovilizada (Vuento *et al.* 1979, *Biochem. J.*, 183(2):331-337). Sin embargo, el uso de resinas de afinidad específicas no es susceptible de procesos comerciales a gran escala. Los motivos para esto incluyen que las propias resinas de afinidad no son suficientemente robustas como para usarse repetidamente e incrementan en general significativamente tanto el tiempo como los costes de procesamiento.

65

5 El documento EP1240200 (US6960463) se refiere a métodos de purificación de fibrinógeno a partir de una disolución que contiene fibrinógeno usando cromatografía de intercambio iónico (IEX). En particular, el método implica aplicar una disolución que contiene fibrinógeno a una matriz de intercambio iónico en condiciones que permiten que el fibrinógeno se una a la matriz y entonces lavar la matriz de intercambio iónico con una disolución que comprende al menos un omega-aminoácido. Esto se hace para promover la retirada diferencial de plasminógeno de la resina. El fibrinógeno que se ha unido a la matriz se eluye entonces de la matriz.

10 El documento WO2012038410 proporciona un método de purificación de fibrinógeno que usa resinas de intercambio aniónico que contienen un soporte polimérico hidroxilado injertado con aminas terciarias o cuaternarias que se unen al fibrinógeno.

15 El documento EP1519944 enseña el uso de una matriz de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados en condiciones en las que el fibrinógeno y el plasminógeno se unen a la matriz, y la elución selectiva del fibrinógeno y del plasminógeno por separado, de modo que la fracción de fibrinógeno principal contiene aproximadamente 600 ng de plasminógeno por mg de proteína.

20 El documento US20050197493 se refiere a un proceso para purificar fibrinógeno, que comprende una o más etapas de proceso en las que una o más proteínas contaminantes se agotan mediante cromatografía negativa y/o adsorción negativa usando un intercambiador catiónico, gel hidrófobo y/o gel de tinción.

25 La presente invención proporciona un método de reducción del nivel de plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular en una disolución que comprende fibrinógeno. La(s) proteína(s) purificada(s) son estables durante su almacenamiento como preparaciones líquidas y pueden usarse para aplicaciones clínicas o veterinarias, incluyendo el tratamiento o la prevención de estados asociados con una deficiencia en el nivel de dicha(s) proteína(s).

Sumario de la invención

30 En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de reducción del nivel de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular en una disolución que comprende al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, comprendiendo el método:

35 (i) hacer pasar una materia prima que comprende al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno a través de una resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba en condiciones seleccionadas de modo que al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular presente en la materia prima se une a la resina; y

40 (ii) recuperar una disolución que comprende la al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, que pasa a través de la resina, reduciéndose la concentración de la al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular en la disolución en al menos el 50% en comparación con la materia prima, estando equilibrada la resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba a un pH de desde aproximadamente 6,5 hasta aproximadamente 8,5 antes de hacer pasar la materia prima y/o la disolución que comprende el fibrinógeno a través de la resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba.

45 En un ejemplo descrito en el presente documento, se proporciona un método de reducción del nivel de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular y otra(s) proteasa(s) en una disolución que comprende al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, factor VIII y factor de von Willebrand (VWF), comprendiendo el método:

50 (i) hacer pasar una materia prima que comprende al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, factor VIII y VWF a través de una primera resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba;

55 (ii) recuperar una disolución que comprende la al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, factor VIII y VWF que pasa a través de la primera resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba;

(iii) hacer pasar la disolución que se ha recuperado en la etapa (ii) a través de una segunda resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba; y

60 (iv) recuperar la disolución que comprende la al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, factor VIII y VWF que pasa a través de la segunda resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba;

65 siendo las condiciones de las etapas cromatográficas tales que al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular y otra(s) proteasa(s) presente en la materia prima se une a la primera y/o segunda resina, y reduciéndose la concentración de la al menos una proteína seleccionada del

grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular y otra(s) proteasa(s) en la disolución que se ha recuperado en la etapa (iv) en al menos el 50% en comparación con la materia prima.

5 En otro ejemplo, se proporciona una disolución que comprende al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, factor VIII y VWF recuperados mediante el método descrito en el presente documento.

En otro ejemplo, se proporciona un recipiente que contiene al menos 5 ml de una disolución de fibrinógeno farmacéuticamente aceptable, siendo la concentración de fibrinógeno de al menos 20 mg/ml.

10 En otro ejemplo, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende una disolución que comprende al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, factor VIII y VWF recuperados mediante el método descrito en el presente documento, y un portador farmacéuticamente aceptable.

15 En otro ejemplo, se proporciona una disolución que comprende:

(a) al menos el 75% de la proteína total de fibrinógeno;

(b) menos de 50 pg/mg de la proteína total de activador de plasminógeno tisular; y/o

20 (c) menos de 1 µg/mg de la proteína total de plasminógeno.

En otro ejemplo, se proporciona una disolución que comprende:

25 (a) al menos el 90% de la proteína total de fibrinógeno;

(b) menos de 50 pg/mg de la proteína total de activador de plasminógeno tisular; y/o

(c) menos de 150 ng/mg de la proteína total de plasminógeno.

30 En otro ejemplo, se proporciona una disolución que comprende:

(a) al menos el 90% de la proteína total de fibrinógeno;

35 (b) menos de 20 pg/mg de la proteína total de activador de plasminógeno tisular; y/o

(c) menos de 10 ng/mg de la proteína total de plasminógeno.

40 En otro ejemplo, se proporciona un método de tratamiento o de prevención de un estado asociado con deficiencia de fibrinógeno, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita la disolución o formulación farmacéutica descrita en el presente documento.

En otro ejemplo, se proporciona el uso de la disolución descrita en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir un estado asociado con deficiencia de fibrinógeno.

45 En otro ejemplo, se proporciona un pegamento de fibrina que comprende la disolución descrita en el presente documento.

En otro ejemplo, se proporciona un método de producción de una disolución de fibrinógeno líquida estable, comprendiendo el método:

50 (i) hacer pasar una materia prima que comprende fibrinógeno a través de una resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba en condiciones seleccionadas de modo que al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular y otra(s) proteasa(s) presente en la materia prima se une a la resina; y

55 (ii) recuperar una disolución que comprende fibrinógeno que pasa a través de la resina, reduciéndose la concentración de la al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular y otra(s) proteasa(s) en la disolución en al menos el 50% en comparación con la materia prima.

60 En otro ejemplo, se proporciona un método de producción de una disolución de fibrinógeno líquida estable, comprendiendo el método:

(i) hacer pasar una materia prima que comprende fibrinógeno a través de una primera resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba;

65

(ii) recuperar una disolución que comprende fibrinógeno que pasa a través de la primera resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba;

5 (iii) hacer pasar la disolución que se ha recuperado en la etapa (ii) a través de una segunda resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba; y

(iv) recuperar una disolución que comprende fibrinógeno que pasa a través de la segunda resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba;

10 siendo las condiciones de las etapas cromatográficas tales que al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular y otra(s) proteasa(s) presente en la materia prima se une a la primera y/o segunda resina, y reduciéndose la concentración de la al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular y otra(s) proteasa(s) en la disolución que se ha recuperado en la etapa (iv) en al menos el 50% en comparación con la materia prima.

15 En otro ejemplo, se proporciona un método para purificar fibrinógeno, comprendiendo el método las etapas de:

(i) hacer pasar una disolución que comprende fibrinógeno a través de una resina de cromatografía de intercambio iónico en condiciones seleccionadas de modo que se une monómero de fibrinógeno a la resina;

20 (ii) eluir el monómero de fibrinógeno de la resina con un tampón de elución; y

(iii) filtrar el monómero de fibrinógeno eluido de la etapa (ii) a través de un filtro que tiene un tamaño de poro en el intervalo de desde aproximadamente 15 nm hasta aproximadamente 35 nm.

25 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el porcentaje de recuperación de fibrinógeno, plasminógeno y t-PA a partir de una disolución de fibrinógeno a lo largo de un intervalo de niveles de pH cuando se hace pasar la disolución a través de un HEA Hypercel™ en modo negativo con respecto a fibrinógeno. Las barras dentro de cada grupo representan (de izquierda a derecha): recuperación de fibrinógeno, recuperación de plasminógeno y recuperación de t-PA.

35 La Figura 2 muestra el porcentaje de recuperación de fibrinógeno, plasminógeno, t-PA y factor II a partir de una disolución de fibrinógeno a lo largo de un intervalo de niveles de pH cuando se hace pasar la disolución a través de un PPA Hypercel™ en modo negativo con respecto a fibrinógeno. Las barras dentro de cada grupo representan (de izquierda a derecha): recuperación de fibrinógeno, recuperación de plasminógeno, recuperación de t-PA y factor II.

40 La Figura 3 muestra el porcentaje de recuperación de fibrinógeno, plasminógeno, t-PA y factor II a partir de una disolución de fibrinógeno a lo largo de un intervalo de niveles de pH cuando se hace pasar la disolución a través de un MEP Hypercel™ en modo negativo con respecto a fibrinógeno. Las barras dentro de cada grupo representan (de izquierda a derecha): recuperación de fibrinógeno, recuperación de plasminógeno, recuperación de t-PA y factor II.

45 La Figura 4a muestra el porcentaje de recuperación de fibrinógeno, plasminógeno, t-PA y factor II a partir de una disolución que contiene fibrinógeno a lo largo de un intervalo de niveles de pH cuando se hace pasar la disolución a través de un HEA Hypercel™ en modo negativo con respecto a fibrinógeno. Las barras dentro de cada grupo representan (de izquierda a derecha): recuperación de fibrinógeno, recuperación de plasminógeno, recuperación de t-PA y recuperación de factor II.

50 La Figura 4b muestra la estabilidad de la disolución que contiene fibrinógeno recuperada de la fracción de caída a través de la columna de HEA Hypercel™ (Figura 4a) a lo largo de 6 días a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C), medida mediante el % de proteína coagulable inicial. Las barras dentro de cada grupo representan (de izquierda a derecha): T = 1 día, T = 3 días, T = 6 días.

55 La Figura 4c muestra la estabilidad de la disolución que contiene fibrinógeno recuperada de la fracción de caída a través de la columna de HEA Hypercel™ (Figura 4a) a lo largo de 6 días a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C), medida mediante el % proteína coagulable. Las barras dentro de cada grupo representan (de izquierda a derecha): T = 1, T = 3 días, T = 6 días.

60 La Figura 5 muestra el porcentaje de recuperación de proceso para fibrinógeno, t-PA, plasminógeno y factor II en fracciones derivadas de un método según una realización de la presente invención, desde el crioprecipitado de plasma hasta el eluato de MacroPrep™-HQ. Las barras dentro de cada grupo representan (de izquierda a derecha): fibrinógeno, fibronectina, plasminógeno, t-PA y factor II.

65 La Figura 6 muestra la pureza de fibrinógeno monomérico que se recuperó de la resina cromatográfica MacroPrep™-HQ medida mediante un cromatograma de HPLC de exclusión por tamaño analítica.

La Figura 7 muestra la capacidad de filtración de fibrinógeno recuperado de la resina cromatográfica MacroPrep™-HQ usando tampones de elución con diferentes conductividades (NaCl 190 mM, 21,5 mS/cm (rombos); NaCl 200 mM, 22,5 mS/cm (cuadrados); NaCl 210 mM, 23,5 mS/cm (triángulos); 1% (p/p) arginina/NaCl 200 mM, 25 mS/cm (cruz)).

La Figura 8 muestra la actividad de fibrinógeno como porcentaje de la actividad de fibrinógeno inicial en t=0 de fibrinógeno líquido recuperado de la resina cromatográfica MacroPrep™-HQ que se almacena a o bien 2-8°C (rombos) durante un periodo de 9 semanas o bien 30°C (cuadrados) durante un periodo de 7 semanas.

Descripción detallada

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra “comprender”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, implica la inclusión de un elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros expresado, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

La referencia en esta memoria descriptiva a cualquier publicación anterior (o información derivada de la misma), o a cualquier materia conocida, no es y no debe tomarse como un reconocimiento o admisión o ninguna forma de sugerencia de que esa publicación anterior (o información derivada de la misma) o materia conocida forme parte del conocimiento general común en el campo de trabajo al que se refiere esta memoria descriptiva.

Debe observarse que, tal como se usa en la memoria descriptiva objeto, las formas en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen aspectos en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “una formulación” incluye una única formulación, así como dos o más formulaciones.

En ausencia de cualquier indicación en contra, la referencia hecha a un contenido en “%” a lo largo de esta memoria descriptiva debe tomarse como que significa % p/p (peso/peso). Por ejemplo, una disolución que comprende al menos el 80% de la proteína total de fibrinógeno debe tomarse como que significa una disolución que comprende fibrinógeno a una concentración de al menos el 80% p/p de la proteína total. Esto puede calcularse, por ejemplo, dividiendo la cantidad de fibrinógeno derivada del ensayo de proteína coagulable entre la cantidad de proteína total derivada de un ensayo de proteína convencional (por ejemplo, biuret) y multiplicando por 100. En el ensayo de proteína coagulable, se añade trombina a una muestra para formar un coágulo, que es casi todo de fibrina. El coágulo puede separarse del sobrenadante que contiene proteínas no coagulables mediante centrifugación. Posteriormente, el coágulo se lava y se disuelve mediante urea alcalina u otras sustancias y la concentración de proteína se determina mediante espectrofotometría. Dado que la mayoría del coágulo es fibrina, la concentración de proteína será equivalente a la concentración de fibrinógeno. Por tanto, la cantidad de proteína coagulable en una muestra es equivalente a la diferencia entre la proteína total y el componente de proteína no coagulable de la muestra.

La purificación de fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF a partir de una materia prima (por ejemplo, sobrenadante de cultivo celular o de plasma) se lleva a cabo normalmente mediante fraccionamiento convencional, en el que el fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF se precipita a partir de la disolución usando, por ejemplo, etanol, sulfato de amonio, β-alanina/glicina, polímeros (por ejemplo, polietilenglicol) y/o disoluciones de fuerza iónica baja. Los métodos de purificación de plasma actuales que emplean diferentes etapas cromatográficas pueden conseguirse un rendimiento relativamente alto y preparaciones homogéneas de una proteína de interés. Sin embargo, estos métodos normalmente dan como resultado preparaciones que comprenden cantidades residuales de impurezas que pueden no ser adecuadas para formular una preparación líquida estable para aplicaciones clínicas. Las impurezas tales como protrombina, activador de plasminógeno tisular (tPA) y plasminógeno son particularmente problemáticas, ya que niveles desestabilizantes de estas impurezas pueden hidrolizar el fibrinógeno en disolución acuosa, convirtiendo así el fibrinógeno en inestable, particularmente durante la fabricación y/o el almacenamiento a largo plazo.

La presente invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que hacer pasar una materia prima que comprende fibrinógeno a través de una resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba (HCIC) y recuperar la disolución que comprende fibrinógeno que pasa a través de la resina es una alternativa eficiente a los procesos de purificación existentes para reducir el nivel desestabilizante de plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular en la disolución.

Por tanto, en un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de reducción del nivel de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular en una disolución que comprende al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, comprendiendo el método:

(i) hacer pasar una materia prima que comprende al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno a través de una resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba en condiciones seleccionadas

de modo que al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular presente en la materia prima se une a la resina; y

(ii) recuperar una disolución que comprende la al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno que pasa a través de la resina, reduciéndose la concentración de la al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular en la disolución en al menos el 50% en comparación con la materia prima; equilibrándose la resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba a un pH de desde aproximadamente 6,5 hasta aproximadamente 8,5 antes de hacer pasar la materia prima y/o la disolución que comprende el fibrinógeno a través de la resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba.

En una realización, la concentración del plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular en la disolución recuperada que comprende fibrinógeno se reduce en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80% o en al menos el 90% o en al menos el 95% o en al menos el 98% en comparación con la materia prima.

En otro ejemplo, se proporciona un método de producción de una disolución de fibrinógeno líquida estable, comprendiendo el método:

(i) hacer pasar una materia prima que comprende fibrinógeno a través de una resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba en condiciones seleccionadas de modo que al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular y otra(s) proteasa(s) presente en la materia prima se une a la resina; y

(ii) recuperar una disolución que comprende fibrinógeno que pasa a través de la resina, reduciéndose la concentración de la al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular y otra(s) proteasa(s) en la disolución en al menos el 50% en comparación con la materia prima.

En una realización, la concentración del plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular y/u otra(s) proteasa(s) en la disolución recuperada que comprende fibrinógeno se reduce en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80% o en al menos el 90% o en al menos el 95% o en al menos el 98% en comparación con la materia prima.

Los procesos cromatográficos emplean normalmente un soporte sólido, también denominado de manera intercambiable en el presente documento resina o matriz. Soportes sólidos adecuados serán familiar para los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen portadores inorgánicos, tales como vidrio y gel de sílice, portadores orgánicos, sintéticos o que se producen de manera natural, tales como agarosa, celulosa, dextrano, poliamida, poliacrilamidas, copolímeros de vinilo de acrilatos bifuncionales, y diversos monómeros hidroxilados, y similares. Portadores disponibles comercialmente se venden con los nombres de resinas Sephadex™, Sepharose™, Hypercel™, Capto™, Fractogel™, MacroPrep™, Unosphere™, GigaCap™, Trisacryl™, Ultrogel™, Dynospheres™, Macrosorb™ y XAD™.

Las etapas de cromatografía se llevarán a cabo generalmente en condiciones no desnaturizantes y a temperaturas convenientes en el intervalo de aproximadamente +10°C a +30°C, más habitualmente a temperaturas aproximadamente ambientales. Las etapas cromatográficas pueden realizarse por lotes o de manera continua, según sea conveniente. Puede emplearse cualquier método de separación conveniente, tal como columna, centrifugación, filtración, decantación, o similares.

La cromatografía por inducción de carga hidrófoba (HCIC), que a menudo también se denomina cromatografía o bien de modo mixto o bien multimodal, resultará familiar para los expertos en la técnica. La HCIC usa restos de unión acoplados a un soporte sólido, pudiendo tener los restos de unión especificidad por una o más proteínas que, según los métodos de la presente invención, representan impurezas en la materia prima (por ejemplo, zimógenos y proteasas, tales como protrombina, tPA y plasminógeno).

Puede usarse cualquier resina de HCIC adecuada conocida por los expertos en la técnica. En una realización, la resina de HCIC comprende un ligando seleccionado del grupo que consiste en mercaptoetilpiridina (4-mercaptoetilpiridina, por ejemplo, MEP Hypercel™), n-hexilamina (por ejemplo, HEA Hypercel™) y fenilpropilamina (por ejemplo, PPA Hypercel™). En una realización, la resina de HCIC comprende n-hexilamina.

Los ligandos de HCIC, tales como HEA, MEP y PPA, tienen una ventana porque permiten la separación basada en la hidrofobicidad superficial de proteínas, pero no requieren la adición de sales liotrópicas vistas a menudo en otros procesos para la purificación de fibrinógeno usando cromatografía hidrófoba (por ejemplo, cromatografía por interacción hidrófoba; HIC). A diferencia de la cromatografía por interacción hidrófoba tradicional, la HCIC se controla en base al pH, en vez de la concentración de sal. Las resinas de HCIC también proporcionan una alta capacidad de unión y altas tasas de flujo, ideales para la purificación tanto a escala de laboratorio como a escala industrial.

Las resinas de HCIC se apilan a menudo en columnas con alturas de lecho de desde aproximadamente 2 cm hasta aproximadamente 40 cm. A escala industrial, las alturas de lecho son habitualmente de al menos 10 cm y están normalmente en el intervalo de desde aproximadamente 15 cm hasta 25 cm. Los diámetros de columna de columnas industriales pueden oscilar entre 20 cm y aproximadamente 1,5 m. Tales columnas se hacen funcionar a tasas de flujo según las instrucciones de fabricación de resina de HCIC con tasas de flujo en el intervalo típico de 50-100 cm/h. La limitación de tasa de flujo superior se debe en parte a las restricciones de presión de la resina de HCIC. Para la resina HEA, por ejemplo, el límite de presión de funcionamiento superior es < 3 bar (< 300 kPa). Las capacidades de unión dinámicas típicas (saturación del 10% de una proteína de unión) para resinas de HCIC son de aproximadamente 20 a 30 mg de proteína unida por ml de resina. Para la presente invención, esto posibilita que se carguen cantidades relativamente grandes de proteína en la columna de HCIC ya que las proteínas abundantes, como el fibrinógeno, pueden pasar a través de la columna, mientras que proteínas menos abundantes tales como el plasminógeno y/o el activador de plasminógeno tisular y/u otra(s) proteasa(s) se unen a la resina de HCIC. Esto resulta ventajoso para la fabricación a escala industrial, ya que se requieren o bien columnas de tamaño más pequeño y/o menos ciclos de columnas para procesar un lote.

Los presentes inventores también han encontrado que el pH de la disolución o materia prima que comprende fibrinógeno que se hace pasar a través de la resina de HCIC según los métodos de la presente invención puede ajustarse para controlar la recuperación del fibrinógeno y la eliminación de impurezas. Por tanto, en una realización dada a conocer en el presente documento, la disolución o materia prima que comprende fibrinógeno que se hace pasar a través de la resina de HCIC tiene un pH de desde aproximadamente 6,5 hasta aproximadamente 8,5. En ejemplos particulares, la disolución o materia prima que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF se hace pasar a través de la resina de HCIC, preferiblemente a un pH de aproximadamente 4,0, 5,0, 5,25, 5,5, 5,75, 6,0, 6,25, 6,5, 6,75, 7,0, 7,25, 7,5, 7,75, 8,0, 8,25, 8,5, 8,75, 9,0, 9,25, 9,5 o 10,0. En una realización particular, la disolución o materia prima que comprende fibrinógeno que se hace pasar a través de la resina de HCIC tiene un pH de aproximadamente 7,0. En ejemplos particulares, la resina de HCIC se equilibra antes de cargar la disolución o materia prima a un pH de aproximadamente 4,0, 5,0, 5,25, 5,5, 5,75, 6,0, 6,25, 6,5, 6,75, 7,0, 7,25, 7,5, 7,75, 8,0, 8,25, 8,5, 8,75, 9,0, 9,25, 9,5 o 10,0.

El método de la presente invención también puede emplear el uso de más de una etapa de cromatografía adicional para eliminar impurezas adicionales, si es necesario, y mejorar así la pureza de la preparación final. Pueden implementarse etapas de purificación cromatográfica adicionales o bien antes o bien después de la purificación de fibrinógeno a través de la resina de HCIC según la presente invención. Por ejemplo, la disolución que comprende fibrinógeno que se recupera de la resina de HCIC en la etapa (ii) puede hacerse pasar a través de otra resina cromatográfica.

Las etapas de purificación cromatográfica adicionales pueden emplear otra resina de HCIC. Por tanto, en otro ejemplo, se proporciona un método de reducción del nivel de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular y otra(s) proteasa(s) en una disolución que comprende al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, factor VIII y factor de von Willebrand (VWF), comprendiendo el método:

(i) hacer pasar una materia prima que comprende al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, factor VIII y VWF a través de una primera resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba;

(ii) recuperar una disolución que comprende la al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, factor VIII y VWF que pasa a través de la primera resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba;

(iii) hacer pasar la disolución que se ha recuperado en la etapa (ii) a través de una segunda resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba; y

(iv) recuperar la disolución que comprende la al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, factor VIII y VWF que pasa a través de la segunda resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba;

siendo las condiciones de las etapas cromatográficas tales que al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular y otra(s) proteasa(s) presente en la materia prima se une a la primera y/o segunda resina, y reduciéndose la concentración de la al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular y otra(s) proteasa(s) en la disolución que se ha recuperado en la etapa (iv) en al menos el 50% en comparación con la materia prima.

En un ejemplo, la concentración del plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular y/u otra(s) proteasa(s) en la disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF que se ha recuperado en la etapa (iv) se reduce en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80% o en al menos el 90% o en al menos el 95% o en al menos el 98% en comparación con la materia prima.

En otro ejemplo, se proporciona un método de producción de una disolución de fibrinógeno líquida estable, comprendiendo el método:

5 (i) hacer pasar una materia prima que comprende fibrinógeno a través de una primera resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba;

(ii) recuperar una disolución que comprende fibrinógeno que pasa a través de la primera resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba;

10 (iii) hacer pasar la disolución que se ha recuperado en la etapa (ii) a través de una segunda resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba; y

(iv) recuperar una disolución que comprende fibrinógeno que pasa a través de la segunda resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba;

15 siendo las condiciones de las etapas cromatográficas tales que al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular y otra(s) proteasa(s) presente en la materia prima se une a la primera y/o segunda resina, y reduciéndose la concentración de la al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular y otra(s) proteasa(s) en la disolución que se ha recuperado en la etapa (iv) en al menos el 50% en comparación con la materia prima.

20 En un ejemplo, la concentración del plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular y/u otra(s) proteasa(s) en la disolución que comprende fibrinógeno que se ha recuperado en la etapa (iv) se reduce en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80% o en al menos el 90% o en al menos el 95% o en al menos el 98% en comparación con la materia prima.

25 En un ejemplo dado a conocer en el presente documento, la segunda resina de HCIC es diferente de la primera resina de HCIC. En otro ejemplo dado a conocer en el presente documento, la primera y la segunda resina de cromatografía por inducción de carga hidrófobas son iguales. Cuando la disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF que se recupera de la resina de HCIC en la etapa (ii) se hace pasar a través de la misma resina de HCIC, puede ser deseable lavar la resina de HCIC tras la etapa (ii) y antes de hacer pasar la disolución recuperada a través de la resina de HCIC en la etapa (iii) de nuevo con el fin de eliminar cualquier impureza que pueda estar unida a la resina.

35 La resina cromatográfica adicional también puede ser una resina cromatográfica de intercambio aniónico. En la cromatografía de intercambio aniónico, las moléculas cargadas negativamente son atraídas por un soporte sólido cargado positivamente. Un soporte sólido cargado positivamente puede prepararse mediante cualquier medio conocido por los expertos en la técnica e implicará habitualmente el acoplamiento covalente de un ligando funcional cargado negativamente sobre un soporte sólido. Los ligandos funcionales cargados negativamente adecuados dependerán invariablemente de la molécula que debe separarse de la disolución. Ejemplos de resinas de intercambio aniónico adecuadas son aquellos que comprenden un grupo amina cuaternaria (Q) y/o un grupo amina terciaria (DEAE) funcional, o un grupo dietilaminopropilo (ANX). Las matrices de cromatografía de intercambio aniónico disponibles comercialmente incluyen, pero no se limitan a, 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 Fast Flow™, Q Sepharose high Performance™, QAE SEPHADDEX™ y FAST Q SEPHAROSE™ de GE Healthcare, WP PEI™, WP DEAM™, WP QUAT™ de J.T. Baker, Hydrocell™ DEAE y 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, DOWEX™ Fine Mesh Strong Base Type I and Type II Anion Matrix y DOWEX™ MONOSPHER E 77, anión de base débil de Dow Liquid Separations, Matrex Cellufine™ A200, A500, Q500 y Q800, de Millipore, Fractogel™ EMD TMAE₃ Fractogel™ EMD DEAE y Fractogel™ EMD DMAE de EMD, intercambiadores aniónicos débiles y fuertes tipo I y II Amberlite™, intercambiadores aniónicos débiles y fuertes tipo I y II DOWEX™, intercambiadores aniónicos débiles y fuertes tipo I y II Diaion™, Duolite™ de Sigma-Aldrich, TSK™ gel Q y DEAE 5PW y 5PW-HR, Toyopearl™ SuperQ-650S, 650M y 650C₃ QAE-- 26 - 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.

60 Si es deseable, puede usarse una membrana de cromatografía de intercambio aniónico en lugar de una matriz de cromatografía de intercambio aniónico. Las membranas de intercambio aniónico disponibles comercialmente incluyen, pero no se limitan a, Sartobind™ Q de Sartorius, Mustang™ Q de Pall Technologies y membrana Intercept™ Q de Millipore.

65 En un ejemplo dado a conocer en el presente documento, la resina de intercambio aniónico es una resina de intercambio aniónico fuerte. En otra realización dada a conocer en el presente documento, la resina de intercambio aniónico fuerte comprende un ligando funcional de amina cuaternaria (por ejemplo, -N⁺(CH₃)₃ tal como se ve, por ejemplo, en MacroPrep™-HQ; Bio-Rad Laboratories). En aún otro ejemplo, la resina de intercambio aniónico son

grupos trimetilamina injertados en un polímero metacrílico hidroxilado por medio de un grupo de conexión, tal como GigaCap Q-650M®.

5 En un ejemplo, la cromatografía de intercambio aniónico se realiza en modo positivo con respecto al fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF. Es decir, las condiciones usadas son tales que, cuando la disolución o materia prima que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF se hace pasar a través de la resina de cromatografía de intercambio aniónico, el fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF se une(n) a los grupos funcionales cargados positivamente acoplados a la resina, permitiendo que impurezas en la disolución pasen a través de la resina en la fracción de flujo a través (de caída a través), cuando pueden desecharse o recuperarse para otros propósitos. Una vez que la fracción de flujo a través pasa a través de la resina, la resina de cromatografía de intercambio aniónico puede lavarse con un tampón de lavado adecuado conocido por los expertos en la técnica. Los constituyentes del tampón de lavado y las condiciones de la etapa de lavado se seleccionarán normalmente para retener el fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF unido a la resina durante la etapa de lavado. El experto en la técnica también reconocerá que la referencia a tampón de lavado, tampón de elución o similar en relación con cromatografía puede incluir disoluciones que tienen una capacidad de tamponamiento limitada o ninguna capacidad.

20 En un ejemplo dado a conocer en el presente documento, antes de eluir el fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF de la resina de cromatografía de intercambio aniónico, la resina se lava con una disolución de lavado que comprende el ácido epsilon-aminocaproico (ϵ -ACA). La adición de ϵ -ACA al tampón de lavado puede promover la elución de proteasas (tal como plasminógeno) que pueden unirse a la resina de cromatografía de intercambio aniónico durante el primer pase. Un ejemplo de una etapa de lavado adecuada se describe en la patente estadounidense 6.960.463.

25 Para eluir el fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF que permanece unido a la resina de cromatografía de intercambio aniónico, puede usarse cualquier tampón de elución adecuado conocido por los expertos en la técnica. Para la eliminación de plasminógeno y/o t-PA y/u otra(s) proteasa(s) de una disolución que comprende fibrinógeno, los presentes inventores han encontrado que un tampón de elución que comprende NaCl desde aproximadamente 150 mM hasta aproximadamente 300 mM permite que se eluyan monómeros de fibrinógeno de la resina de intercambio aniónico al tiempo que se minimiza la elución de agregados de fibrinógeno y/u otras proteínas (por ejemplo, factor VIII, VWF, fibronectina o proteasas) que también pueden estar unidos a la resina. Por tanto, en un ejemplo dado a conocer en el presente documento, el fibrinógeno se eluye de la resina de intercambio aniónico con un tampón de elución que comprende NaCl desde aproximadamente 150 mM hasta aproximadamente 300 mM. Esto equivale a un tampón de elución que tiene un intervalo de conductividad de aproximadamente 18 mS/cm (NaCl 150 mM) a aproximadamente 32 mS/cm (NaCl 300 mM).

35 En otro ejemplo, el fibrinógeno se eluye de la resina de intercambio aniónico con un tampón de elución que comprende NaCl desde aproximadamente 150 mM hasta aproximadamente 270 mM. Esto equivale a un tampón de elución que tiene un intervalo de conductividad de aproximadamente 18 mS/cm (NaCl 150 mM) a aproximadamente 29 mS/cm (NaCl 270 mM).

40 En otro ejemplo, el fibrinógeno se eluye de la resina de intercambio aniónico con un tampón de elución que comprende NaCl desde aproximadamente 170 mM hasta aproximadamente 230 mM. Esto equivale a un tampón de elución que tiene un intervalo de conductividad de aproximadamente 19 mS/cm (NaCl 170 mM) a aproximadamente 25 mS/cm (NaCl 230 mM).

45 En otro ejemplo, el fibrinógeno se eluye de la resina de intercambio aniónico con un tampón de elución que comprende NaCl desde aproximadamente 200 mM hasta aproximadamente 220 mM. Esto equivale a un tampón de elución que tiene un intervalo de conductividad de aproximadamente 22 mS/cm (NaCl 200 mM) a aproximadamente 24 mS/cm (NaCl 220 mM).

50 En otro ejemplo, el fibrinógeno se eluye de la resina de intercambio aniónico con un tampón de elución que comprende NaCl desde aproximadamente 190 mM hasta aproximadamente 210 mM.

55 En otro ejemplo, el fibrinógeno se eluye de la resina de intercambio aniónico con un tampón de elución que comprende NaCl desde aproximadamente 150 mM hasta aproximadamente 190 mM.

En otro ejemplo, el tampón de elución tiene una conductividad en el intervalo de 18 a 32 mS/cm; o de 20 a 25 mS/cm; o de 21 a 23,5 mS/cm; o de 22 a 23 mS/cm. En un ejemplo preferido, la conductividad del tampón de elución es de aproximadamente 22,5 mS/cm.

60 En un ejemplo dado a conocer en el presente documento, el tampón de elución comprende un aminoácido libre a una concentración que promueve la elución de monómero de fibrinógeno sobre agregados del mismo. En otro ejemplo, el tampón de elución comprende un aminoácido libre a una concentración de aproximadamente el 0,5 al 10% (p/p). Puede usarse cualquier aminoácido libre adecuado en esta capacidad. En un ejemplo, el aminoácido libre es arginina. En otro ejemplo, el tampón de elución comprende arginina en el intervalo de aproximadamente el 4 a aproximadamente el 10% (p/p).

65

En otros ejemplos, el tampón de elución comprende NaCl 200 mM, arginina al 0,5% (p/p); o NaCl 160 mM, arginina al 1% (p/p).

5 En un ejemplo, la cromatografía de intercambio aniónico se realiza en modo negativo con respecto al fibrinógeno y modo positivo con respecto a factor VIII y/o VWF. Es decir, las condiciones usadas son tales que, cuando la disolución o materia prima que comprende fibrinógeno y factor VIII y/o VWF se hace pasar a través de la resina de cromatografía de intercambio aniónico, el factor VIII y/o VWF se une(n) a los grupos funcionales cargados positivamente acoplados a la resina, permitiendo que el fibrinógeno en la disolución pase a través de la resina en la fracción de flujo a través (de caída a través). Una vez que la fracción de flujo a través que contiene fibrinógeno pasa a través de la resina, la resina de cromatografía de intercambio aniónico puede lavarse con un tampón de lavado adecuado conocido por los expertos en la técnica. Los constituyentes del tampón de lavado y las condiciones de la etapa de lavado se seleccionarán normalmente para retener el factor VIII y/o VWF unido a la resina durante la etapa de lavado.

15 En un ejemplo, la disolución o materia prima que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF se hace pasar a través de la resina de cromatografía de intercambio aniónico en presencia de NaCl de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 270 mM. Esto equivale a un intervalo de conductividad de aproximadamente 18 mS/cm (NaCl 150 mM) a aproximadamente 29 mS/cm (NaCl 270 mM). En estas condiciones, el fibrinógeno, particularmente la forma monomérica, pasa a través de la resina de cromatografía de intercambio aniónico mientras que los agregados que contienen fibrinógeno y otras impurezas, tales como IgG y fibronectina, se unen a la resina. En ejemplos adicionales, la disolución o materia prima que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF se hace pasar a través de la resina de cromatografía de intercambio aniónico en presencia de NaCl de aproximadamente 170 mM a aproximadamente 230 mM (de aproximadamente 19 mS/cm a aproximadamente 25 mS/cm) o NaCl de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 220 mM (de aproximadamente 22 mS/cm a aproximadamente 24 mS/cm). En estos tipos de condiciones, se espera que el factor VIII y/o VWF se unirá a la resina de cromatografía de intercambio aniónico.

El factor VIII y/o VWF pueden eluirse de la resina de intercambio aniónico con un tampón de elución que comprende al menos 300 mM de una sal, tal como NaCl. En una realización particular el factor VIII y/o VWF se eluyen de la resina de intercambio aniónico con NaCl aproximadamente 500 mM. Cuando se unen fibrinógeno y factor VIII y/o VWF a la resina de intercambio aniónico, la etapa de elución puede realizarse de modo que el fibrinógeno se eluya inicialmente (por ejemplo, usando las condiciones expuestas anteriormente) y entonces el factor VIII y/o VWF puede eluirse usando una concentración mayor de sal, tal como NaCl 500 mM.

35 Cuando se emplea una etapa de cromatografía de intercambio aniónico, puede realizarse o bien antes y/o bien después de hacer pasar la materia prima que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF a través de la resina de HCIC. En un ejemplo dado a conocer en el presente documento, el método comprende además hacer pasar la disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF que se ha recuperado en la etapa (ii) a través de una resina de cromatografía de intercambio aniónico. En otro ejemplo, cuando se emplean etapas de cromatografía HCIC primera y segunda, tal como se describe en el presente documento, el método que comprende además hacer pasar la disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF que se ha recuperado en la etapa (ii) y/o etapa (iv) a través de una resina de cromatografía de intercambio aniónico.

En un ejemplo dado a conocer en el presente documento, el método comprende además hacer pasar la materia prima que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF a través de una resina de cromatografía de intercambio aniónico antes de la etapa (i).

Los expertos en la técnica entenderán que el número de etapas cromatográficas adicionales usadas según la presente invención dependerá del nivel de pureza requerido en la preparación final. Por ejemplo, el método de la presente invención puede comprender 2, 3, 4 o 5 etapas de cromatografía, tal como se dan a conocer en el presente documento. Por ejemplo, cuando el método comprende 2 etapas de cromatografía, la secuencia de etapas será HCIC/IEX o HCIC/HCIC o IEX/HCIC; cuando el método comprende 3 etapas de cromatografía, la secuencia de etapas será HCIC/IEX/HCIC o HCIC/HCIC/IEX o HCIC/HCIC/HCIC o HCIC/IEX/IEX o IEX/HCIC/HCIC o IEX/HCIC/IEX o IEX/IEX/HCIC; cuando el método comprende 4 etapas de cromatografía, la secuencia de etapas será HCIC/IEX/HCIC/HCIC o HCIC/HCIC/IEX/HCIC o HCIC/HCIC/HCIC/IEX o HCIC/HCIC/HCIC/HCIC o HCIC/IEX/IEX/HCIC o HCIC/IEX/IEX/IEX o HCIC/HCIC/IEX/IEX o HCIC/IEX/HCIC/IEX o IEX/HCIC/IEX/HCIC o IEX/HCIC/HCIC/IEX o IEX/HCIC/HCIC/HCIC o IEX/HCIC/IEX/IEX o IEX/IEX/HCIC/HCIC o IEX/IEX/HCIC/HCIC o IEX/IEX/HCIC/HCIC; etcétera (donde "IEX" indica cromatografía de intercambio aniónico). El nivel de pureza requerido puede estar dictado por el uso pretendido de la disolución (por ejemplo, para el tratamiento de un paciente con una deficiencia de fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF) y/o cuando se requiere un periodo de almacenamiento más prolongado como preparación acuosa.

La cromatografía puede realizarse usando cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las etapas de cromatografía según la presente invención pueden usar columnas de flujo axial, tales como las disponibles de GE Healthcare, Pall Corporation y Bio-Rad, o columnas de flujo radial, tales como las disponibles de Proxycs. Las etapas de cromatografía según la presente invención también pueden realizarse usando tecnologías de lecho expandido.

En un ejemplo, la concentración del plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular y/u otra(s) proteasa(s) en la disolución recuperada que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF se reduce en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80% o en al menos el 90% o en al menos el 95% en comparación con la materia prima.

Métodos que maximizan la eliminación de impurezas tales como plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular y/u otra(s) proteasa(s) son particularmente ventajosos, porque se mejora de manera decisiva la estabilidad y eficacia del fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF en disolución, particularmente durante su almacenamiento a largo plazo. El almacenamiento en forma líquida es particularmente ventajoso para disoluciones que comprenden fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF porque es posible el uso inmediato en un paciente. Esto está en contraste con el uso de preparaciones liofilizadas de fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF purificado, que requieren la reconstitución de la(s) proteína(s) liofilizada(s) en un tampón adecuado y/o agua para inyección inmediatamente antes de la administración a un sujeto que lo necesita.

Una ventaja de agotar las proteasas o sus zimógenos (tal como plasminógeno) de una disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF es que esto minimiza la necesidad de añadir agentes antifibrinolíticos para inhibir cualquier proteasa y/o zimógeno residual (por ejemplo, plasmina o plasminógeno). Los ejemplos de tales agentes incluyen aprotinina, un inhibidor proteico bovino de plasmina; ácido ortranexámico, un inhibidor de plasmina sintético también asociado con efectos secundarios neurotóxicos.

Una característica ventajosa adicional es que el plasminógeno, que se ha separado de la disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF mediante HCIC, puede procesarse adicionalmente para producir un concentrado que contiene plasminógeno para, por ejemplo, uso clínico. Por tanto, la HCIC puede usarse para preparar tanto plasminógeno como disoluciones que comprenden fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF a partir de una única disolución de partida.

Una característica ventajosa adicional es que los costes de producción de la resina de HCIC son mucho más económicos que el coste la resina de lisina-Sepharose™ o de lisina inmovilizada que se usan en procedimientos de cromatografía por afinidad.

Una característica ventajosa adicional es que la HCIC podría usarse para sustituir las etapas de hidróxido de aluminio (por ejemplo, Alhydrogel™) para la eliminación de proteasas (por ejemplo, factor II). Alhydrogel™ actualmente se usa ampliamente en la producción comercial de factor VIII y VWF. Sin embargo, el material es relativamente costoso, usándose normalmente cientos de kg por lote. Además, alhydrogel™ a menudo requiere manipulación manual y el material se desecha tras un único uso. Por el contrario, las etapas de HCIC pueden ser completamente automatizadas y la resina puede usarse en la fabricación de múltiples lotes.

Otra característica ventajosa es que la resina de HCIC es compatible con NaOH 1 M, que puede usarse para la inactivación y eliminación de patógenos, incluyendo virus y priones durante procedimientos de limpieza de columnas y de saneamiento de resinas.

Las preparaciones líquidas derivadas de los métodos de la presente invención también tienen ventajas con respecto al uso de preparaciones congeladas, que requieren medios de almacenamiento y transporte caros y tienen que descongelarse antes de su uso inmediato. Incluso cuando el fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF se almacena como preparación liofilizada o congelada, resulta ventajoso que la proteína reconstituida o descongelada sea estable durante más tiempo. Esto resulta evidente, por ejemplo, cuando se ha reconstituido material como precaución para un procedimiento médico, pero su uso no se requería basándose en consideraciones médicas. Este material se desecha normalmente, ya que el fibrinógeno solo es estable a lo largo de un periodo de corto plazo debido a la presencia de protrombina y/o t-PA y/u otra(s) proteasa(s).

En ejemplos particulares, las preparaciones líquidas que contienen fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF se almacenan como preparación líquida o liofilizada o congelada.

En otro ejemplo, se proporciona un método para purificar fibrinógeno, comprendiendo el método las etapas de:

(i) hacer pasar una disolución que comprende fibrinógeno a través de una resina de cromatografía de intercambio iónico en condiciones seleccionadas de modo que se une monómero de fibrinógeno a la resina;

(ii) eluir el monómero de fibrinógeno de la resina con un tampón de elución; y

(iii) filtrar el monómero de fibrinógeno eluido de la etapa (ii) a través de un filtro que tiene un tamaño de poro en el intervalo de desde aproximadamente 15 nm hasta aproximadamente 35 nm.

En un ejemplo, la disolución que comprende fibrinógeno (etapa (i)) se recupera tras hacer pasar una materia prima que comprende fibrinógeno a través de una resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba en

condiciones seleccionadas de modo que el plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular y/u otra(s) proteasa(s) se une a la resina y el fibrinógeno pasa a través de la resina.

5 En un ejemplo, la resina de cromatografía de intercambio iónico se selecciona de una resina cromatográfica de intercambio aniónico o una resina de cromatografía de intercambio catiónico.

10 En un ejemplo, la resina de cromatografía de intercambio aniónico es una resina cromatográfica de intercambio aniónico fuerte o una resina cromatográfica de intercambio aniónico débil. En un ejemplo, la resina de cromatografía de intercambio aniónico comprende un grupo amino cuaternario. Los ejemplos incluyen alquilamina cuaternaria y alquilalcanolamina cuaternaria, o amina, dietilamina, dietilaminopropilo, amino, trimetilammonioetilo, trimetilbencilo amonio, dimetiletanolbencilamonio y poliamina. En algunas realizaciones, la resina de cromatografía de intercambio aniónico es un soporte polimérico injertado con aminas terciarias o cuaternarias o es un soporte polimérico hidroxilado injertado con aminas terciarias o cuaternarias. En algunas realizaciones, la resina de cromatografía de intercambio aniónico comprende un soporte polimérico de metacrilato. En un ejemplo, la resina de cromatografía de intercambio aniónico es una MacroPrep™ HQ. En otro ejemplo, la resina de cromatografía de intercambio aniónico es una GigaCap™ Q-650M. En otros ejemplos, la resina de cromatografía de intercambio aniónico se empaqueta en una columna.

20 Si es deseable, puede usarse una membrana de cromatografía de intercambio aniónico en lugar de una resina de cromatografía de intercambio aniónico. Las membranas de cromatografía de intercambio aniónico disponibles comercialmente incluyen, pero no se limitan a, Sartobind™ Q de Sartorius, Mustang™ Q de Pall Technologies y membrana Intercept™ Q de Millipore.

25 En un ejemplo, la resina de cromatografía de intercambio catiónico es una resina de cromatografía de intercambio catiónico fuerte o una resina de cromatografía de intercambio catiónico débil.

30 Las resinas de cromatografía de intercambio catiónico disponibles comercialmente incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, aquellas que tienen un grupo a base de sulfonato (por ejemplo, MonoS, MiniS, Source™ 15S y 30S, SP Sepharose Fast Flow™, SP Sepharose High Performance™ de GE Healthcare, Toyopearl™ SP-650S y SP-650M de Tosoh, Macro-Prep High™ S de BioRad, Ceramic HyperD™ S, Trisacryl™ M y LS™ SP y Spherodex™ LS SP de Pall Technologies.); un grupo a base de sulfoetilo (por ejemplo, Fractogel™ SE de EMD, Poros™ S-10 y S-20 de Applied Biosystems); un grupo a base de sulfopropilo (por ejemplo, TSK™ Gel SP 5PW y SP-5PW-HR de Tosoh, Poros™ HS-20 y HS 50 de Applied Biosystems); un grupo a base de sulfoisobutilo (por ejemplo, Fractogel™ EMD SO3™ de EMD); un grupo a base de sulfoxietilo (por ejemplo, SE52, SE53 y Express-Ion S de Whatman), un grupo a base de carboximetilo (por ejemplo, CM Sepharose Fast Flow™ de GE Healthcare, Hydrocell™ CM de Biochrom Labs Inc., Macro-Prep™ CM de BioRad, Ceramic HyperD™ CM, Trisacryl™ M CM, Trisacryl™ LS CM, de Pall Technologies, Matrex Cellufine™ C500 y C200 de Millipore, CM52™, CM32™, CM23™ y Express™ - Ion C de Whatman, Toyopearl™ CM-650S, CM-650M y CM-650C de Tosoh); grupos a base de ácido sulfónico y carboxílico (por ejemplo, BAKERBOND™ Carboxy-Sulfon de J.T. Baker); un grupo a base de ácido carboxílico (por ejemplo, WP™ CBX de J.T Baker, DOWEX MAC-3™ de Dow Liquid Separations, Amberlite™ Weak Cation Exchangers, DOWEX™ Weak Cation Exchanger, y Diaion™ Weak Cation Exchangers de Sigma-Aldrich y Fractogel™ EMD COO- de EMD); un grupo a base de ácido sulfónico (por ejemplo, Hydrocell™ SP de Biochrom Labs Inc., DOWEX™ Fine Mesh Strong Acid Cation Matrix de Dow Liquid Separations, UNOSphere™ S, WP Sulfonic de J. T. Baker, membrana Sartobind™ S de Sartorius, Amberlite™ Strong Cation Exchangers, DOWEX™ Strong Cation y Diaion Strong Cation Exchanger de Sigma-Aldrich); y un grupo a base de ortofosfato (por ejemplo, PI 1 de Whatman). Si es deseable, puede usarse una membrana de cromatografía de intercambio catiónico en lugar de una matriz de intercambio catiónico, por ejemplo, Sartobind™ S (Sartorius; Edgewood, NY).

50 En un ejemplo, la disolución que comprende fibrinógeno tiene un pH en el intervalo de aproximadamente pH 7 a pH 10. En un ejemplo, el pH de la disolución que comprende fibrinógeno es de aproximadamente pH 8. En algunos ejemplos, la resina de cromatografía de intercambio aniónico se preequilibrará y lavará tras cargar el fibrinógeno con tampón/tampones que tiene(n) un pH similar al de la disolución que comprende el fibrinógeno.

55 En un ejemplo, el tampón de elución tiene una conductividad en el intervalo de desde aproximadamente 18 hasta aproximadamente 30 mS/cm. Por ejemplo, la conductividad del tampón de elución puede estar en el intervalo de aproximadamente 18 a aproximadamente 25 mS/cm; o de aproximadamente 19 a aproximadamente 24 mS/cm; o de aproximadamente 20 a aproximadamente 24 mS/cm; o de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 mS/cm. En un ejemplo, la conductividad del tampón de elución es de aproximadamente 22 mS/cm. En otros ejemplos, el tampón de elución comprende NaCl. En un ejemplo, el tampón de elución comprende NaCl a una concentración en el intervalo de aproximadamente 180 mM a aproximadamente 230 mM, o de aproximadamente 190 mM a aproximadamente 210 mM. En un ejemplo, la concentración de NaCl en el tampón de elución es de aproximadamente 200 mM.

65 En un ejemplo, el tampón de elución que comprende el fibrinógeno contiene una concentración de proteína de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg/ml. En algunos ejemplos, la concentración de proteína del tampón de elución que comprende el fibrinógeno está en el intervalo de desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente

8 mg/ml. En ejemplos particulares, el tampón de elución que comprende el fibrinógeno es de aproximadamente 6 mg/ml.

5 En un ejemplo el monómero de fibrinógeno eluido se formula con uno o más aminoácidos antes de filtrar (etapa (iii)). En un ejemplo, el aminoácido es arginina o glicina o una combinación de las mismas. En algunos ejemplos, la concentración del aminoácido en el tampón de elución que comprende fibrinógeno está en el intervalo de desde aproximadamente el 0,5 hasta aproximadamente el 10% (p/p). En un ejemplo, la concentración del aminoácido en el tampón de elución que comprende fibrinógeno es de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 6% (p/p), o de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 6% (p/p) o de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 5% (p/p). En un ejemplo, el tampón de elución que comprende el fibrinógeno se formula con aproximadamente el 2% o aproximadamente el 3% o aproximadamente el 4% o aproximadamente el 5% (p/p) de arginina.

10 En un ejemplo, el monómero de fibrinógeno eluido tiene un pH de desde aproximadamente pH 7 hasta aproximadamente pH 9.

15 En un ejemplo, el filtro de etapa (ii) tiene un tamaño de poro en el intervalo de desde aproximadamente 15 nm hasta aproximadamente 35 nm; o desde aproximadamente 15 nm hasta aproximadamente 30 nm; o desde aproximadamente 15 nm hasta aproximadamente 25 nm; o desde aproximadamente 15 nm hasta aproximadamente 20 nm.

20 La filtración de virus puede realizarse usando o bien filtración de flujo tangencial (TFF) o filtración "terminal" (también conocida como filtración de flujo normal). Los filtros de virus se diseñaron originariamente para su uso en TFF con la alimentación fluyendo adyacente a la capa delgada superior de la membrana asimétrica. La TFF proporciona un alto flujo barriendo la superficie de la membrana para reducir la incrustación y la polarización por concentración. Sin embargo, la simplicidad y el menor coste de capital de la filtración terminal ha conducido al uso extendido de filtros de virus diseñados específicamente para filtración terminal. A diferencia de la TFF, estos filtros terminales se hacen funcionar normalmente con el lado más abierto de la membrana dirigido hacia la corriente de alimentación, permitiendo que los agregados de proteína y otros incrustantes grandes se capturen dentro de la subestructura macroporosa protegiendo de ese modo la capa delgada de retención de virus. Las ventajas de usar filtros terminales de un solo uso incluyen que tanto simplifican el diseño como la validación del sistema, reduciendo los costes de trabajo y de capital.

25 La filtración terminal implica normalmente usar una única bomba para forzar fluido a través de la membrana desde la superficie.

30 La filtración tangencial requiere generalmente una primera bomba para mantener una tasa de flujo constante en la superficie de la membrana de filtro y una segunda bomba extrae la proteína a través de la membrana creando una presión negativa en la parte trasera de la membrana.

35 En un ejemplo, la filtración se realiza mediante filtración terminal.

40 En un ejemplo, el proceso de filtración terminal se realiza usando o bien filtración a presión constante o bien filtración a velocidad constante. En un ejemplo, el proceso de filtración terminal se realiza usando filtración a presión constante.

45 La filtración se realiza normalmente con una presión de filtración que es igual a o está por debajo del nivel que puede resistir la membrana, dependiendo del material de una membrana de eliminación de virus para su uso en el presente documento, por ejemplo, con presiones de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 3,4 bar. En una realización, la presión de filtración se mantiene entre aproximadamente 0,2 bar y aproximadamente 3,4 bar. En otro ejemplo, la presión de filtración se mantiene a de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 bar; o a de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 bar; o a de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 2 bar. En otro ejemplo, la presión de filtración se mantiene a de aproximadamente 1,5 bar a aproximadamente 1,9 bar.

50 La temperatura puede tener un efecto sobre la viscosidad de una disolución de proteína y sobre el flujo tras la filtración con una membrana de eliminación de virus. Se entenderá por parte de los expertos en la técnica que la disolución que debe usarse en la etapa de filtración debe tener normalmente una temperatura dentro del intervalo de desde aproximadamente 0°C hasta la temperatura a la que se desnaturaliza la proteína de interés. La temperatura de la disolución se encuentra de manera adecuada dentro del intervalo de desde aproximadamente 10°C hasta aproximadamente 50°C. En una realización, la temperatura de la disolución se encuentra dentro del intervalo de desde aproximadamente 18°C hasta aproximadamente 35°C. En otra realización, la disolución se filtra a temperatura ambiente de desde aproximadamente 18°C hasta aproximadamente 26°C.

55 En un ejemplo, la capacidad de filtro de virus es de al menos 0,20 kg o al menos 0,50 kg o al menos 0,75 kg o al menos 1,00 kg o al menos 1,25 kg o al menos 1,50 kg o al menos 2 kg de fibrinógeno por m² de área superficial de filtro.

Opcionalmente, puede realizarse una etapa de prefiltración o filtración por clarificación antes de la filtración de virus con el fin de eliminar las partículas de tamaño macroscópico. En un ejemplo, se realiza una prefiltración con un prefiltro que comprende una membrana con un diámetro de poro más grande que el de la membrana de eliminación de virus. En un ejemplo, el prefiltro es un filtro de membrana que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 0,1 μm . En otro ejemplo, el prefiltro se selecciona del filtro de membrana Pall Nylon (SKL 7002 NTP 0,1 μm o FTKNI), u otros prefiltros disponibles comercialmente que tienen propiedades similares para la eliminación de agregados y/o particulados de proteína. La prefiltración puede realizarse o bien en línea con el filtro de virus o bien fuera de línea con respecto al filtro de virus. En un ejemplo, la prefiltración se realiza en línea con respecto al filtro de virus.

Los expertos en la técnica conocerán filtros adecuados para el método de filtración de virus según este aspecto de la invención. Un ejemplo incluye Planova BioEx™, entre otros. Tales filtros se denominan en ocasiones filtros de eliminación “de virus pequeños”.

En un ejemplo, la membrana de filtro es una lámina plana o una membrana de fibras huecas. Los ejemplos de membranas de lámina plana incluyen membranas de filtro PVDF hidrofílicas tales como los filtros de eliminación de virus pequeños Pegasus™ Grade SV4 (Pall Corporation). En un ejemplo, el filtro es el Pegasus™ Grade SV4.

En otros ejemplos, el filtro es una membrana de fibras huecas. Una membrana de fibras huecas puede contener un haz de fibras huecas en forma de pajita conteniendo la pared de cada fibra hueca una estructura de red tridimensional de poros compuestos de huecos interconectados mediante capilares finos. Los ejemplos de filtros de fibras huecas incluyen los filtros Planova™ BioEX™ (Asahi Kasei Corporation) que incorporan poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) modificado hidrófilo en un formato de membrana de fibras huecas. En una realización, el filtro es el Planova™ BioEX.

En un ejemplo, se usan dos o más filtros de virus pequeños en serie. En una realización, la filtración se realiza usando dos filtros en serie que tienen un tamaño de poro en el intervalo de desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 20 nm. Tales etapas de filtración tienen el potencial de posibilitar que se fabrique fibrinógeno con al menos LRV 6,9 log LRV para MVM similar a parvovirus.

En otro ejemplo, la disolución que comprende fibrinógeno se hace pasar a través de una resina de cromatografía de intercambio iónico en condiciones seleccionadas de modo que el fibrinógeno presente en la disolución pasa a través de la resina. Es decir, la cromatografía de intercambio iónico se realiza en modo negativo con respecto a fibrinógeno en condiciones tales que, cuando la disolución se hace pasar a través de la resina, impurezas tales como agregados de fibrinógeno, plasminógeno y fibronectina presentes en la disolución se unen(n) a los grupos funcionales cargados acoplados a la resina, permitiendo que el fibrinógeno presente en la disolución, particularmente monómero de fibrinógeno, pase a través de la resina en la fracción de flujo a través (de caída a través). Una vez que la fracción de flujo a través que contiene fibrinógeno pasa a través de la resina, la resina de cromatografía de intercambio iónico puede lavarse con un tampón de lavado adecuado conocido por los expertos en la técnica. Los constituyentes del tampón de lavado y las condiciones de la etapa de lavado se seleccionarán normalmente para retener las impurezas unidas a la resina durante la etapa de lavado.

En un ejemplo, la resina de cromatografía de intercambio iónico se selecciona de una resina cromatográfica de intercambio aniónico o una resina de cromatografía de intercambio catiónico.

En un ejemplo, la disolución que comprende fibrinógeno se hace pasar a través de una resina de cromatografía de intercambio aniónico en presencia de NaCl de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 270 mM. Esto equivale a un intervalo de conductividad de aproximadamente 18 mS/cm (NaCl 150 mM) a aproximadamente 29 mS/cm (NaCl 270 mM). En estas condiciones el fibrinógeno, particularmente la forma monomérica, pasa a través de la resina de cromatografía de intercambio aniónico mientras que los agregados que contienen fibrinógeno y otras impurezas tales como plasminógeno y fibronectina se unen a la resina. En ejemplos adicionales, la disolución que comprende fibrinógeno se hace pasar a través de la resina de cromatografía de intercambio aniónico en presencia de NaCl de aproximadamente 170 mM a aproximadamente 230 mM (de aproximadamente 19 mS/cm a aproximadamente 25 mS/cm) o NaCl de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 220 mM (de aproximadamente 22 mS/cm a aproximadamente 24 mS/cm). En estos tipos de condiciones, se espera que las impurezas se unan a la resina de cromatografía de intercambio aniónico, permitiendo que el fibrinógeno pase a través de la resina en la fracción de flujo a través.

La disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF recuperados mediante los métodos descritos en el presente documento son ventajosas porque proporcionan una preparación de fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF que tiene una mayor estabilidad que las preparaciones liofilizadas existentes, incluso a temperatura ambiente. Esto puede ser particularmente ventajoso en rutas de transporte largas, en la que puede que las bajas temperaturas, cuando sea apropiado, no estén garantizadas durante todo el transporte y/o almacenamiento. El almacenamiento estable de fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF en disolución también facilita, en muchos aspectos, la producción, la utilización, el transporte y la administración a un paciente que lo necesite. Debido a la estabilidad aumentada del fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF preparados según los métodos descritos en el presente documento, es posible en

muchas preparaciones farmacéuticas prescindir de la adición de agentes de estabilidad, tales como inhibidores de la fibrinólisis o fibrinogenólisis que pueden, en algunas circunstancias, conducir a efectos secundarios no deseados o que deben evitarse para reducir riesgos potenciales.

5 El término “estable”, tal como se usa en el presente documento, significa que hay poca o ninguna pérdida sustancial de actividad del fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF tras un periodo de tiempo en almacenamiento en comparación con el nivel de actividad del fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF antes del almacenamiento (por ejemplo, en comparación con el nivel de actividad determinado inmediatamente tras la recuperación de la disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF según los métodos descritos en el presente documento). En un ejemplo dado a conocer en el presente documento, la disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF retiene al menos el 70% de actividad, preferiblemente al menos el 80% de actividad, más preferiblemente al menos el 90% de actividad, incluso más preferiblemente al menos el 95% de actividad y lo más preferiblemente el 100% de actividad tras un periodo de tiempo en almacenamiento a una temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 30°C. El experto en la técnica entenderá que la actividad de fibrinógeno puede determinarse para la preparación de fibrinógeno inmediatamente antes del inicio del periodo de almacenamiento y este valor inicial puede usarse para designar el 100% de actividad a partir de la que la actividad de fibrinógeno determinada en diferentes puntos de tiempo durante el periodo de almacenamiento puede compararse y expresarse como porcentaje de este valor inicial.

20 En un ejemplo dado a conocer en el presente documento, el fibrinógeno recuperado mediante los métodos descritos en el presente documento retiene desde aproximadamente el 90% hasta el 100% de actividad tras al menos 4 semanas en almacenamiento de la disolución a una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C, preferiblemente retiene aproximadamente el 90% de actividad tras 4 semanas en almacenamiento de la disolución a una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C. En otro ejemplo dado a conocer en el presente documento, el fibrinógeno retiene desde aproximadamente el 60% hasta aproximadamente el 80% de actividad tras al menos 4 semanas en almacenamiento de la disolución a una temperatura de aproximadamente 30°C, preferiblemente retiene desde aproximadamente el 60% hasta aproximadamente el 70% de actividad tras 5 semanas en almacenamiento de la disolución a una temperatura de aproximadamente 30°C. El nivel de actividad del fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF puede determinarse mediante cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Ejemplos de métodos adecuados para determinar la actividad de fibrinógeno, por ejemplo, se resumen por Mackie *et al.* (British J. Haematol. 121:396-404, 2003). Métodos particulares incluyen Clauss (Clauss, 1957, Acta-Haematol. 17, 237-246) y/o proteína coagulable (Jacobsson K., Scand J Clin Lab Invest 1955;7 (supp 14):1-54 o Fibrin sealant Ph. Eur. Monograph 903, 2012). Los resultados pueden notificarse como % de proteína coagulable; % de proteína coagulable inicial, y/o % de actividad de fibrinógeno inicial determinados usando el método Clauss o similares.

El experto en la técnica entenderá que es probable que la concentración del plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular y/u otra(s) proteasa(s) en la disolución recuperada que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF dicte la longitud de almacenamiento y/o las condiciones de almacenamiento (por ejemplo, temperatura). Por ejemplo, se entenderá que una preparación en la que la concentración del plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular y/u otra(s) proteasa(s) en la disolución recuperada se reduce en el 80% en comparación con la materia prima puede almacenarse durante un periodo de tiempo más prolongado y/o a temperaturas más altas sin desestabilizar significativamente la actividad del fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF en comparación con una preparación en la que la concentración del plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular y/u otra(s) proteasa(s) en la disolución recuperada que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF se reduce en solo el 50% en comparación con la materia prima.

Aunque los métodos de la presente invención pueden realizarse a escala de laboratorio, pueden escalarse hasta tamaño industrial sin cambios significativos en las condiciones. Por tanto, en una realización dada a conocer en el presente documento, los métodos de la presente invención se realizan a escala industrial o comercial. Preferiblemente, los métodos de la invención son adecuados para la fabricación a escala comercial de fibrinógeno. Por ejemplo, cuando se usan fracciones de plasma como material de partida en el método de la invención, entonces la fabricación a escala comercial implicaría el uso de una fracción de plasma derivada de al menos aproximadamente 500 kg de plasma. Más preferiblemente, la fracción de plasma de partida se derivará de al menos aproximadamente 5.000 kg, 7.500 kg, 10.000 kg y/o 15.000 kg de plasma por lote. En ejemplos particulares, las disoluciones y formulaciones farmacéuticas que comprenden fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF se fabrican a escala comercial a partir de una fracción de plasma o una materia prima recombinante.

60 Cuando deba usarse una disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF para aplicaciones clínicas o veterinarias (por ejemplo, para su administración a un sujeto con deficiencia de fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF o para su uso como pegamento de fibrina), los expertos en la técnica entenderán que puede ser deseable reducir el nivel de contenido de virus activo (título de virus) y otros agentes infecciosos potenciales (por ejemplo, priones) en la disolución. Esto puede ser deseable particularmente cuando la materia prima que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF (es decir, el material de partida) se deriva de plasma sanguíneo. Los expertos en la técnica conocerán métodos de reducción del título de virus en una disolución. Los ejemplos incluyen pasteurización (por ejemplo, incubando la disolución a 60°C durante 10 horas en presencia de altas concentraciones de estabilizadores tales

como glicina (por ejemplo, 2,75 M) y sacarosa (por ejemplo, al 50%) y/u otras sales o excipientes seleccionados), tratamiento por calor seco, filtración de virus (hacer pasar la disolución a través de un nanofiltro; por ejemplo, punto de corte de 20 nm) y/o sometiendo la disolución a tratamiento con un detergente o disolvente orgánico adecuado durante un periodo de tiempo y en condiciones para inactivar el virus en la disolución. El disolvente/detergente se ha usado durante más de 20 años para inactivar virus con envuelta, particularmente en productos derivados de plasma, incluyendo fibrinógeno y factor VIII y/o VWF. Por tanto, puede llevarse a cabo usando diversos reactivos y métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 4540573 y US4764369 que se incorporan por la presente como referencia). Los disolventes adecuados incluyen fosfato de tri-n-butilo (TnBP) y éter, preferiblemente TnBP (normalmente a aproximadamente el 0,3%). Los detergentes adecuados incluyen polisorbato (Tween) 80, polisorbato (Tween) 20 y Triton X-100 (normalmente a aproximadamente el 0,3%). La selección de condiciones de tratamiento, incluyendo concentraciones de disolvente y de detergente, depende en parte de las características de la materia prima, requiriendo generalmente materias primas menos puras concentraciones más altas de reactivos y más condiciones de reacción más extremas. Un detergente preferido es polisorbato 80 y una combinación particularmente preferida es polisorbato 80 y TnBP. La materia prima puede agitarse con reactivos de disolvente y detergente a una temperatura y durante un tiempo suficiente para inactivar cualquier virus con envuelta que pueda estar presente. Por ejemplo, el tratamiento con disolvente/detergente puede llevarse a cabo durante aproximadamente 4 horas a 25°C. Los productos químicos de disolvente/detergente se eliminan posteriormente mediante, por ejemplo, adsorción sobre medios cromatográficos tal como resinas hidrófobas C-18 o eluyéndolas en la fracción de caída a través de resinas de intercambio iónico en condiciones que adsorben la proteína de interés.

La etapa de inactivación de virus puede realizarse en cualquier fase de los métodos dados a conocer en el presente documento. En un ejemplo, la materia prima que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF se somete a una etapa de inactivación viral antes de la etapa (i). En otra realización, la disolución que comprende fibrinógeno que se recupera de la resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba (es decir, de las etapas (ii) y/o (iv)) se somete a una etapa de inactivación viral. En un ejemplo dado a conocer en el presente documento, la etapa de inactivación viral comprende pasteurización o tratamiento con un detergente y disolvente orgánico. En otro ejemplo dado a conocer en el presente documento, la etapa de inactivación de virus comprende filtración de virus. Cuando se usa filtración de virus, los inventores han encontrado que la adición de un aminoácido libre (por ejemplo, arginina) antes de la etapa de filtración puede mejorar significativamente la tasa de flujo y la recuperación de fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF a través del filtro. Un ejemplo de tal método se describe en el documento US7919592.

En un ejemplo dado a conocer en el presente documento, la materia prima o disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF se somete a una etapa de inactivación viral antes de hacerla pasar a través de la resina de cromatografía de intercambio aniónico. La ventaja de emplear una etapa de inactivación de virus tal como tratamiento con disolvente/detergente antes de hacer pasar la disolución o materia prima tratada a través de una resina de cromatografía de intercambio aniónico es que la resina de intercambio aniónico permite la eliminación del detergente y disolvente orgánico de la disolución tratada utilizando condiciones que promueven la unión del fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF a la resina y la eliminación del detergente y disolvente orgánico con la fracción de flujo a través (de caída a través).

La pasteurización puede generar agregados de proteína y polímeros, particularmente en una disolución que comprende fibrinógeno (también denominada en el presente documento "disolución de fibrinógeno"). Por tanto, puede ser deseable en algunos casos reducir el nivel de agregados/polímeros en una disolución pasteurizada. Esto puede conseguirse mediante cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, aunque convenientemente puede conseguirse mediante una purificación cromatográfica adicional. En un ejemplo dado a conocer en el presente documento, la disolución o materia prima pasteurizada se hace pasar a través de una resina de cromatografía de intercambio aniónico en modo positivo con respecto al fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF de modo que se elimina cualquier agregado o polímero con la fracción de flujo a través (de caída a través).

El término "materia prima" se usa en el presente documento para designar cualquier disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF. La materia prima también puede comprender otras proteínas (por ejemplo, proteínas terapéuticas) conocidas por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen proteínas implicadas en la cascada de coagulación sanguínea. En una realización dada a conocer en el presente documento, la materia prima comprende fibrinógeno.

Los expertos en la técnica conocerán una materia prima adecuada que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF. Los ejemplos incluyen plasma o fracciones de plasma tales como crioprecipitado de plasma solubilizado o pasta de fracción I solubilizada derivada de plasma humano o animal o una fracción de plasma, fracciones de cultivo celular de tecnología recombinante, fracciones derivadas de leche de animales transgénicos, etc. Fuentes de proteínas de fibrinógeno recombinantes también son adecuadas para su uso como materia prima según la presente invención. Cuando la materia prima es plasma o una fracción de plasma, pueden ser o bien donaciones de plasma combinadas o bien puede ser de un donante individual. En una realización dada a conocer en el presente documento, la materia prima que comprende fibrinógeno es un crioprecipitado de plasma solubilizado. Este componente, o bien derivado de sangre completa o bien recogido por medio de aféresis, se prepara mediante la descongelación controlada de plasma recién congelado entre 1-6°C y la recuperación del precipitado. El precipitado insoluble en frío vuelve a congelarse. Una unidad de aféresis de crioprecipitado es equivalente aproximadamente a 2

unidades de crioprecipitado derivado de sangre completa. Contiene la mayor parte del fibrinógeno, factor VIII y VWF junto con otras proteínas tales como factor XIII y fibronectina de plasma recién congelado. Una fuente alternativa de fibrinógeno es el precipitado de fracción I que puede prepararse a partir de plasma congelado descongelando y eliminando el crioprecipitado mediante o bien centrifugación o bien filtración. El criosobrenadante resultante se mezcla entonces con etanol para precipitar la fracción I. Por ejemplo, puede obtenerse un precipitado de fracción I añadiendo etanol aproximadamente al 8% (v/v) a pH 7,2 y controlando la temperatura hasta aproximadamente -3°C (Cohn, *et al.* 1946, J. Am. Chem. Soc. 62: 459-475). En una realización, la materia prima que comprende fibrinógeno es crioprecipitado.

La referencia en la memoria descriptiva a “proteasa(s)” puede ser a cualquier proteasa y/o su zimógeno presente en la materia prima o disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF que, cuando se expone a una resina de HCIC, puede unirse a resina de HCIC en condiciones en las que el fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF pasa a través de la resina. Las proteasas pueden ser de cualquier tipo, incluyendo serina proteasas (por ejemplo, plasmina, trombina, tripsina), treonina proteasas, cisteína proteasas (por ejemplo, catepsina B y catepsina H), aspartato proteasas (por ejemplo, pepsina), metaloproteasas (por ejemplo, colagenasas y gelatinasas) y proteasas glutámicas. Cuando la materia prima que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF se deriva de plasma humano o animal, las proteasas/zimógenos pueden incluir plasminógeno, activador de plasminógeno tisular (tPA), trombina, elastasa, factor VIIa, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa, factor XIIIa, calicreínas plasmáticas y similares. Con respecto a las disoluciones que comprenden fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF, una proteasa/zimógeno preferida particular que debe eliminarse es plasminógeno. Otras proteasas/zimógenos preferidos que deben eliminarse de una disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF son t-PA, protrombina y/o trombina activa (factor II/IIa). Cuando la materia prima que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF se deriva de sobrenadante de cultivo celular, la proteasa/zimógeno puede incluir cualquier proteasa de célula huésped, tal como serina proteasas (por ejemplo, caseinasas), metaloproteasas (por ejemplo, gelatinasas, metaloproteasas de matriz (MMP), incluyendo MMP3, MMP10 o MMP12), proteasas aspárticas (catepsina D), proteasas ácidas entre otras.

En algunos casos, puede ser deseable eliminar o reducir el nivel de impurezas de la materia prima antes de hacer pasar la materia prima a través de una resina de HCIC en la etapa (i). Eliminar o reducir el nivel de impurezas de la materia prima puede reducir la carga sobre la resina de HCIC durante la purificación cromatográfica y mejorar así la eficiencia de separación de plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular y/u otra(s) proteasa(s) de la materia prima. Las impurezas pueden eliminarse o reducirse, por ejemplo, precipitando fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF a partir de la materia prima y recuperando la(s) proteína(s) precipitada(s). Los expertos en la técnica conocerán métodos adecuados de precipitación de fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF a partir de una materia prima que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF. Un ejemplo incluye añadir suspensión de hidróxido de aluminio a la materia prima, que es particularmente útil para eliminar proteínas dependientes de la vitamina K (por ejemplo, los factores de coagulación II, VII, IX, y X) y otras proteínas que tienen afinidad de unión por el hidróxido de aluminio, tal como protrombina (factor II) y t-PA, de plasma o crioprecipitado de plasma.

Por tanto, en un ejemplo dado a conocer en el presente documento, antes de la etapa (i), las proteínas dependientes de la vitamina K se eliminan o se reducen de la materia prima. En un ejemplo adicional, las proteínas dependientes de la vitamina K se eliminan o se reducen mediante la adición de hidróxido de aluminio a la materia prima. El hidróxido de aluminio puede estar en forma de Alhydrogel®, añadido a la materia prima hasta una concentración final de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 80% p/p. En algunos ejemplos, el hidróxido de aluminio se añade a la materia prima hasta una concentración final en el intervalo de desde aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 50% (p/p). En otros ejemplos, el hidróxido de aluminio se añade a la materia prima hasta una concentración final en el intervalo de desde aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 30% (p/p). En ejemplos preferidos, la concentración es de desde aproximadamente el 15% hasta aproximadamente el 30% (p/p). Lo más preferiblemente, el hidróxido de aluminio se añade a la materia prima a de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 25% (p/p) para una recuperación de fibrinógeno óptima y una eliminación de impurezas tales como protrombina. En otro ejemplo, las proteínas dependientes de la vitamina K se eliminan de la materia prima mediante adsorción por lotes usando hidróxido de aluminio.

En otro ejemplo, se proporciona una disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF que se recuperado mediante el método descrito en el presente documento. En un ejemplo, el nivel de plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular y/u otra(s) proteasa(s) en la disolución será de menos del 20% de la proteína total, preferiblemente menos del 10% de la proteína total y más preferiblemente menos del 5% de la proteína total, o menos del 1% de la proteína total o menos del 0,1% de la proteína total o menos del 0,01% de la proteína total o menos del 0,001% de la proteína total o menos del 0,0001% de la proteína total. El experto en la técnica entenderá que el nivel de plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular y/u otra(s) proteasa(s) que está presente en la disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF puede depender del uso pretendido de la disolución o la duración de almacenamiento. Por ejemplo, cuando la disolución debe almacenarse durante al menos 4 semanas a una temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 8°C, puede ser aceptable que la disolución comprenda más de aproximadamente el 10% de plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular y/u otra(s) proteasa(s) (de la proteína total). Cuando la disolución debe almacenarse durante al menos 4 semanas a una temperatura de aproximadamente 30°C, puede ser deseable que la disolución comprenda menos de

aproximadamente el 10% de plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular y/u otra(s) proteasa(s) (de la proteína total).

5 En un ejemplo dado a conocer en el presente documento, se proporciona una disolución que comprende fibrinógeno recuperado mediante el método descrito en el presente documento. En otro ejemplo, la disolución comprende al menos el 80% de la proteína total de fibrinógeno.

En otro ejemplo, se proporciona una disolución que comprende:

- 10 (a) al menos el 75% de la proteína total de fibrinógeno;
- (b) menos de 50 pg/mg de la proteína total de activador de plasminógeno tisular; y/o
- 15 (c) menos de 1 µg/mg de la proteína total de plasminógeno.

En un ejemplo, la disolución comprende además menos de $1,5 \times 10^{-5}$ U/mg de la proteína total de factor II.

En otro ejemplo, se proporciona una disolución que comprende:

- 20 (a) al menos el 90% de la proteína total de fibrinógeno;
- (b) menos de 50 pg/mg de la proteína total de activador de plasminógeno tisular; y/o
- 25 (c) menos de 150 ng/mg de la proteína total de plasminógeno.

En un ejemplo, la disolución comprende además:

- (a) menos de $3,5 \times 10^{-6}$ U/mg de la proteína total de factor II; y/o
- 30 (b) menos de 150 µg/mg de la proteína total de fibronectina.

En otro ejemplo, se proporciona una disolución que comprende:

- 35 (a) al menos el 90% de la proteína total de fibrinógeno;
- (b) menos de 50 pg/mg de la proteína total de activador de plasminógeno tisular; y/o
- (c) menos de 10 ng/mg de la proteína total de plasminógeno.

40 En otro ejemplo, se proporciona una disolución que comprende:

- (a) al menos el 90% de la proteína total de fibrinógeno;
- 45 (b) menos de 20 pg/mg de la proteína total de activador de plasminógeno tisular; y/o
- (c) menos de 10 ng/mg de la proteína total de plasminógeno.

En un ejemplo, la disolución comprende además:

- 50 (a) menos de $2,7 \times 10^{-6}$ U/mg de la proteína total de factor II; y/o
- (b) menos de 15 µg/mg de la proteína total de fibronectina.

55 La concentración del fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF en la disolución recuperada mediante los métodos dados a conocer en el presente documento y la concentración de impurezas (por ejemplo, plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular y/u otra(s) proteasa(s)) pueden medirse mediante cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Ejemplos de ensayos adecuados para medir fibrinógeno se describen por Mackie *et al.* (Br J Haematol. mayo de 2003;121(3):396-404). La HPLC de exclusión por tamaño también puede usarse para medir la concentración de fibrinógeno y/o factor VIII o una impureza en la disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII (por ejemplo, Cardinali *et al.* 2010, Arch. Biochem. Biophys. 493(2):157-168; y Kosloski *et al.* 2009, AAPS J. 11(3); 424-431). La HPLC también permite que el experto en la técnica discrimine entre monómeros y agregados de fibrinógeno. Además, la concentración de fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF puede diferir dependiendo de la sensibilidad del ensayo que se usa. Por ejemplo, la concentración de fibrinógeno en una disolución medida usando el ensayo Clauss puede ser ligeramente menor que la concentración medida en la misma disolución mediante HPLC.

65

En un ejemplo dado a conocer en el presente documento, la concentración de fibrinógeno monomérico en la disolución es de al menos el 75%, al menos el 80%, al menos 85%, al menos el 90% o al menos el 95% de la proteína total medida mediante HPLC de exclusión por tamaño.

5 En otro ejemplo, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende una disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF recuperados mediante los métodos dados a conocer en el presente documento, y un portador farmacéuticamente aceptable. Los expertos en la técnica conocerán portadores farmacéuticamente aceptables adecuados, incluyendo diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos incluyen disolventes, medios de dispersión, agentes antifúngicos y antibacterianos, tensioactivos, agentes isotónicos y de absorción y similares.

10 La formulación farmacéutica también puede formularse mediante la adición de una combinación de estabilizadores adecuados, por ejemplo, un aminoácido, un carbohidrato, una sal y un detergente. En ejemplos particulares, el estabilizador comprende una mezcla de un alcohol de azúcar y un aminoácido. El estabilizador puede comprender una mezcla de un azúcar (por ejemplo, sacarosa o trehalosa), un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol o sorbitol), y un aminoácido (por ejemplo, prolina, glicina y arginina). En un ejemplo preferido, la formulación comprende un aminoácido tal como arginina. En otros ejemplos, la formulación comprende iones de metal divalente en una concentración de hasta 100 mM y un agente complejante descrito en el documento US7045601. Los ejemplos particulares incluyen las formulaciones 1 a 7 descritas en el ejemplo 1 del documento US7045601. En ejemplos particulares, la formulación se formula sin la adición de ningún agente antifibrinolítico o proteína estabilizante tal como albúmina. En ejemplos en los que la formulación comprende fibrinógeno, el pH es preferiblemente de aproximadamente 6,5 a 7,5 y la osmolalidad es de al menos 240 mOsmol/kg.

15 La formulación farmacéutica también puede esterilizarse mediante filtración antes de la dispensación y el almacenamiento a largo plazo. Preferiblemente, la formulación retendrá sustancialmente sus características de estabilidad originales durante al menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36 o más meses. Por ejemplo, las formulaciones almacenadas a 2-8°C o 25°C pueden normalmente retener sustancialmente la misma distribución de tamaño molecular medida mediante HPLC-SEC cuando se almacena durante 6 meses o más. Ejemplos particulares de la formulación farmacéutica pueden ser estables y adecuados para el uso farmacéutico comercial durante al menos 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 36 meses o incluso más cuando se almacena a 2-8°C y/o temperatura ambiente.

20 Las disoluciones y formulaciones farmacéuticas, tal como se describen en el presente documento, pueden formularse en una de muchas formas de dosificación posibles, tales como formulaciones inyectables. Las formulaciones y su administración (dosificación) posterior están dentro del conocimiento de los expertos en la técnica. La dosificación depende de la respuesta del sujeto al tratamiento, pero durará invariablemente tanto como se requiera el efecto deseable (por ejemplo, una vuelta a niveles en plasma normales de fibrinógeno). Los expertos habituales en la técnica pueden determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición.

25 En un ejemplo dado a conocer en el presente documento, la formulación farmacéutica tiene un volumen de al menos 5 ml y comprende al menos 5 mg/ml de fibrinógeno. En otro ejemplo, la formulación farmacéutica tiene un volumen de al menos 5 ml y comprende al menos 20 mg/ml de fibrinógeno. En realizaciones particulares, la formulación farmacéutica tiene un volumen de al menos 5 ml y comprende fibrinógeno a una concentración de aproximadamente 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml, 50 mg/ml, 55 mg/ml, 60 mg/ml, 65 mg/ml, 70 mg/ml, 75 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml o 100 mg/ml. En otro ejemplo, se proporciona un recipiente que contiene al menos 5 ml de una disolución de fibrinógeno farmacéuticamente aceptable, siendo la concentración de fibrinógeno de al menos 20 mg/ml.

30 En otro ejemplo, se proporciona un método de tratamiento o de prevención de un estado asociado con deficiencia de fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF recuperado mediante el método, tal como se da a conocer en el presente documento, o la formulación farmacéutica, tal como se da a conocer en el presente documento.

35 En otro ejemplo, se proporciona el uso de una disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF recuperado mediante el método, tal como se da a conocer en el presente documento, en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir un estado asociado con deficiencia de fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con los tipos de estados asociados con deficiencia de fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF. En un ejemplo, el estado de fibrinógeno se selecciona del grupo que consiste en afibrinogenemia, hipofibrinogenemia y disfibrinogenemia. En un ejemplo, el estado de factor VIII y/o VWF se selecciona del grupo que consiste en hemofilia A, trastornos hemorrágicos (por ejemplo, función plaquetaria defectuosa, trombocitopenia o enfermedad de von Willebrand), lesión vascular, sangrado a partir de traumatismo o cirugía, sangrado debido a terapia anticoagulante, sangrado debido a enfermedad hepática.

40 Otros estados que pueden tratarse con una disolución que comprende fibrinógeno y/o factor VIII y/o VWF recuperado mediante los métodos, tal como se da a conocer en el presente documento, incluyen heridas

importantes y hemorragias y quemaduras graves. En casos de hipofibrinogenemia y afibrinogenemia, una disolución que comprende fibrinógeno preparada mediante los métodos descritos en el presente documento puede inyectarse por vía intravenosa en el paciente que lo necesite con el fin de compensar el estado de deficiencia de fibrinógeno y el experto en la técnica puede determinar las dosificaciones basándose en el grado de deficiencia.

Una disolución que comprende fibrinógeno recuperado mediante los métodos dados a conocer en el presente documento también tiene ventajas en el uso de pegamento de fibrinas (también conocido como sellantes de fibrina) debido a la ausencia de niveles desestabilizantes de plasminógeno y/o activador de plasminógeno tisular y/u otra(s) proteasa(s). El tPA convierte el plasminógeno en su forma activa plasmina, que a su vez digiere el coágulo de fibrina y reduce así la formación de coágulos tras la aplicación tópica (por ejemplo, para hemostasia).

Los pegamentos de fibrina comprenden normalmente dos componentes: (i) fibrinógeno (frecuentemente junto con factor XIII y un inhibidor de fibrinólisis tal como aprotinina), y (ii) trombina (frecuentemente junto con iones calcio). Los dos componentes se reconstituyen con el fin de preparar el pegamento listo para su uso. El pegamento de fibrina se usa en aplicaciones clínicas y veterinarias para simular la última etapa de coagulación a través de la formación de fibras de fibrina ligadas en cruz usando una combinación de fibrinógeno con trombina en presencia de calcio y factor XIII. El pegamento de fibrina tiene diversas aplicaciones en la medicina clínica y veterinaria, incluyendo hemostasia, cierre de heridas, profilaxis de adhesión y curación de heridas. El pegamento de fibrina también puede usarse para cerrar heridas cutáneas (incluyendo trasplante de piel), para sellar suturas y para unir tejidos conjuntivos, tales como hueso, cartílago y tendones. Por tanto, en otro ejemplo dado a conocer en el presente documento, se proporciona un pegamento de fibrina que comprende la disolución que comprende fibrinógeno recuperado mediante los métodos, tal como se da a conocer en el presente documento.

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas a las descritas específicamente. Debe entenderse que la invención incluye todas de tales variaciones y modificaciones que se encuentren dentro del espíritu y el alcance. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos a los que se hace referencia o indicados en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones de cualquiera de dos o más de dichas etapas o características.

Ahora se describirán determinadas realizaciones de la invención con referencia a los siguientes ejemplos que están previstos solo con el propósito de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la generalidad descrita anteriormente en el presente documento.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Purificación de fibrinógeno a través de resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba (HCIC) HEA, PPA y MEP

Se usó crioprecipitado de plasma combinado humano como material de partida (es decir, material prima que contiene fibrinógeno). Brevemente, el crioprecipitado de plasma combinado se solubilizó en un tampón de extracción que contenía citrato de trisodio 20 mM, ácido epsilon-aminocaproico (ϵ -ACA) 200 mM, 60 IU/ml de heparina y NaCl 500 mM (pH $7,2 \pm 2$) a $31 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 30 minutos (1 g crioprecipitado por 4 g de tampón). Entonces se añadió hidróxido de aluminio al 2% (p/p) al crioprecipitado solubilizado a una concentración del 25% (p/p), tras lo cual se eliminó el gel de hidróxido de aluminio mediante o bien centrifugación o bien filtración profunda y se recuperó el sobrenadante que contenía fibrinógeno para purificación cromatográfica adicional a través de una resina de cromatografía HCIC.

El sobrenadante que contenía fibrinógeno se aplicó a columnas de cromatografía que se habían empaquetado con 1,8 ml de resina o bien HEA, PPA o bien MEP Hypercel™. Las columnas de cromatografía se preequilibraron en Tris 25 mM a un pH diferente, que oscilaba entre 6,5 y 8,5. El sobrenadante que contenía fibrinógeno se cargó en la columna de cromatografía a una razón de aproximadamente 11 ml/ml de resina. La purificación mediante HCIC se realizó en modo negativo con respecto a fibrinógeno, en la que se permitió que el fibrinógeno cayera a través en la fracción de flujo a través no unida, mientras que la mayoría de t-PA, plasminógeno y factor II permaneció unida a la resina.

Las Figuras 1 a 3 muestran la recuperación por etapas de fibrinógeno, plasminógeno, t-PA y factor II tras la purificación cromatográfica usando HEA Hypercel™, PPA Hypercel™ y MEP Hypercel™. Los resultados muestran que el pH tiene poco o ningún efecto sobre la unión de plasminógeno a estas resinas, mientras que la unión de t-PA a las resinas parece ser lo más efectiva en el intervalo de pH inferior. La columna HEA Hypercel™ mostró la mayor recuperación de fibrinógeno en la fracción de caída a través y el intervalo de pH operativo sometido a prueba parecía tener poco efecto sobre la recuperación de fibrinógeno en comparación con la observada para columnas tanto PPA como MEP Hypercel™. Las columnas tanto PPA como MEP mostraron la mayor recuperación de fibrinógeno en la fracción de caída a través a pH 8,5.

Ejemplo 2 - Nivel de impurezas en una disolución de fibrinógeno reducida a través de HEA Hypercel

Se aplicaron aproximadamente 48,5 ml de crioprecipitado solubilizado que contenía fibrinógeno preparado según el ejemplo 1 sobre una columna HEA Hypercel™ de 5 ml que se había preequilibrado en Tris 25 mM a pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 o bien 8,5. Se realizó la purificación por HCIC en modo negativo con respecto a fibrinógeno, en el que se permitió que el fibrinógeno cayera a través en la fracción de flujo a través no unida, mientras que el t-PA, plasminógeno y factor II permanecieron unidos a la resina. La Figura 4a muestra la recuperación por etapas de fibrinógeno, plasminógeno, t-PA y factor II durante la purificación postcromatográfica usando HEA Hypercel™. Los resultados muestran que el pH tenía poco o ningún efecto sobre la unión de plasminógeno y factor II a la resina de HCIC, mientras que la unión de t-PA a la resina parecía ser lo más efectiva al intervalo de pH inferior de 6,5-7,0. La recuperación de fibrinógeno era mayor del 90% en la fracción de caída a través en condiciones de pH diferentes a pesar de no realizar ningún lavado de columna. Tal como se muestra en la Figura 4a, estos resultados demuestran la eliminación efectiva de proteasas en una materia prima que contiene fibrinógeno crudo, tal como crioprecipitado solubilizado, mediante la resina de HCIC. Por ejemplo, la condición experimental realizada a pH 7,0 demostró una reducción de $\geq 99,9\%$ para factor II, del 88,3% para t-PA y de $\geq 98,2\%$ para plasminógeno a partir de la disolución de crioprecipitado solubilizado.

El fibrinógeno permaneció estable en disolución durante al menos 6 días a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). Los resultados se presentan en las Figuras 4b y 4c.

Ejemplo 3 - Nivel de impurezas en una disolución de fibrinógeno purificada a través de HEA Hypercel

Se cargaron aproximadamente 500 ml del sobrenadante que contenía fibrinógeno obtenido tras la etapa de adsorción de alhydrogel™ generada según el ejemplo 1 en una columna XK 16/30 empaquetada con 36 ml de resina HEA Hypercel™, preequilibrada en Tris 25 mM pH 7,0. La fracción de caída a través se recogió para someter a prueba el fibrinógeno, plasminógeno, t-PA y factor II. Se proporciona un resumen de los resultados en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1

	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Fibrinógeno mediante Clauss (mg/ml)	Plasminógeno (ng/ml)	t-PA (pg/ml)	Factor II (U/ml)
Sobrenadante de fibrinógeno	500	21,8	16,0	53172,0	1716,5	0,00097
Fracción de caída a través	540	17,6	13,2	15655,5	706,7	0,00025
% de recuperación en la fracción de caída a través		87,2%	89,1%	31,8%	44,5%	27,8%

Ejemplo 4 - El efecto de la precipitación de glicina sobre el nivel de impurezas en una disolución de fibrinógeno purificada a través de HEA Hypercel

Se sometió el sobrenadante que contenía fibrinógeno tras la etapa de adsorción de alhydrogel generada según el ejemplo 1 a una etapa de precipitación adicional añadiendo una solución salina que comprendía glicina 2,4 M, NaCl 2,7 M, CaCl₂ 2,1 mM y citrato de trisodio 23 mM (pH 6,6-7,3). El precipitado solubilizado se calentó hasta 30°C antes de añadirse al tampón de glicina, que también se incubó hasta 30°C, a una razón de producto con respecto a tampón de 1:2. Se permitió que la mezcla se agitase durante 10 minutos y se recuperó el precipitado resultante de la fase líquida mediante centrifugación. La fase líquida, que contenía predominantemente fibronectina e IgG, se desechó y se recogió el precipitado que contenía fibrinógeno y se resuspendió en un tampón de solubilización que contenía NaCl 100 mM, CaCl₂ 1,1 mM, citrato de trisodio 10 mM, Tris-(hidroximetilmetilamina) 10 mM y sacarosa 4,5 mM (pH 7,0). Se clarificó el producto intermedio de fibrinógeno solubilizado (250 ml) usando un filtro de 1 µm antes de hacerse pasar a través de una columna XK 16/30 empaquetada con 36 ml de resina HEA Hypercel™ preequilibrada en Tris 25 mM pH 7,0. La fracción de caída a través se recogió para someter a prueba el fibrinógeno, plasminógeno, t-PA y factor II y se proporciona un resumen de los resultados en la tabla 2 a continuación.

Los resultados demuestran que la unión de plasminógeno, t-PA y factor II a la resina HEA Hypercel™ era más efectiva en estas condiciones de procesamiento en comparación con la observada en las condiciones descritas en el ejemplo 2. Los resultados de caracterización muestran una recuperación por etapas de aproximadamente el 93% para fibrinógeno, del 6% para plasminógeno, del 12% para t-PA y del 5% para factor II.

Tabla 2

	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Fibrinógeno mediante Clauss (mg/ml)	Plasminógeno (ng/ml)	t-PA (µg/ml)	Factor II (U/ml)
Producto intermedio de fibrinógeno solubilizado	250,0	29,7	30,3	48457,0	3408,4	0,002
Fracción de caída a través	285,2	26,4	24,6	2646,8	984,2	0,00008
% de recuperación en la fracción de caída a través		101%	92,6	6,2%	12,3%	4,6%

Ejemplo 5 - Preparación de fibrinógeno purificado a partir de crioprecipitado de plasma

- 5 Etapa de proceso 1 - solubilización de crioprecipitado de plasma;
- 10 Etapa de proceso 2 – adsorción de Alhydrogel™ (hidróxido de aluminio) (concentración de Alhydrogel™: objetivo del 15 al 20% p/p, oscilando entre el 10 y el 50% p/p) de crioprecipitado de plasma solubilizado y recuperación de sobrenadante que contenía fibrinógeno usando métodos tales como centrifugación o filtración profunda en presencia de una ayuda de filtro. Alternativamente, esta etapa puede sustituirse por o bien una etapa de cromatografía HCIC en modo negativo (caída a través) con respecto a fibrinógeno o bien una combinación de cromatografía de HCIC y de intercambio aniónico ambas en modo negativo con respecto al fibrinógeno. Si se usan cromatografía tanto HCIC como de intercambio aniónico en combinación, entonces la etapa de proceso 3 es opcional;
- 15 Etapa de proceso 3 - precipitación de glicina de fibrinógeno a partir del sobrenadante que contenía fibrinógeno de la etapa 2. Alternativamente, esta etapa puede sustituirse por una cromatografía de intercambio aniónico en modo negativo con respecto al fibrinógeno;
- 20 Etapa de proceso 4 - hacer pasar el precipitado de glicina solubilizado de la etapa 3 a través de una resina de cromatografía HCIC en modo negativo con respecto a fibrinógeno;
- 25 Etapa de proceso 5 - tratar la disolución de fibrinógeno purificada recuperada en la etapa 4 con disolvente o detergente o pasteurización para inactivar patógenos;
- 30 Etapa de proceso 6 - hacer pasar la disolución tratada de la etapa 5 a través de una resina de cromatografía de intercambio aniónico en modo positivo con respecto a fibrinógeno, lavar las proteínas unidas débilmente de la resina y eluir el fibrinógeno de la resina;
- 35 Etapa de proceso 7 - someter el fibrinógeno eluido de la resina de intercambio aniónico en la etapa 6 a nanofiltración (35 nm o 20 nm o una combinación de 35/20 nm); y
- Etapa de proceso 8 - someter el fibrinógeno filtrado de la etapa 7 a ultrafiltración (filtros de membrana de 50, 100, 200 y 300 kDa).

Ejemplo 6 - Preparación de fibrinógeno purificado mediante la combinación de HCIC y cromatografía de intercambio aniónico

- 40 Se completaron tres experimentos a escala de laboratorio en los que se prepararon aproximadamente 100 g de crioprecipitado según las etapas descritas en los ejemplos 1 a 3 hasta la etapa de cromatografía de modo mixto usando una columna HEA Hypercel™.
- 45 La fracción de caída a través de la columna HEA Hypercel™, que contenía predominantemente fibrinógeno, se sometió a un tratamiento con disolvente/detergente durante la noche para la inactivación de virus.
- 50 La disolución inactivada para los virus se diluyó entonces hasta ≤ 10 mS/cm usando Tris 25 mM (pH 8,0) antes de cargarse en una columna de intercambio aniónico (XK 50/30, GE Healthcare), empaquetada con aproximadamente 412 ml de resina MacroPrep™-HQ que se había preequilibrado con Tris 25 mM (pH 8,0). Se desechó la fracción de flujo a través y se lavó la columna MacroPrep™-HQ con 4 volúmenes de columna de un tampón de lavado que contenía NaCl 90 mM, Tris 50 mM, EACA 20 mM (pH 8,0). En estas condiciones cromatográficas, la fracción de flujo a través inicial y las fracciones de lavado contenían predominantemente plasminógeno y t-PA, mientras que el fibrinógeno permanecía unido a la resina cromatográfica. La forma monomérica de fibrinógeno se eluyó selectivamente de la columna MacroPrep™-HQ usando un tampón de elución que comprendía NaCl 200 mM, Tris 10 mM, citrato de trisodio 10 mM, sacarosa 46 mM y CaCl₂ 1,1 mM (pH 7,0), dejando agregados de fibrinógeno y
- 55 proteínas de bajo peso molecular unidas a la resina MacroPrep™-HQ.

Los productos intermedios de producto generados a partir del crioprecipitado solubilizado hasta el eluato de cromatografía MacroPrep™-HQ se caracterizaron para los niveles de fibrinógeno, t-PA, plasminógeno, fibronectina y factor II y las recuperaciones de etapa de proceso para cada una de estas proteínas en las diversas fases de proceso. Los resultados se muestran en la tabla 3, que representan un valor medio de tres lotes de consistencia a escala de laboratorio independientes. La recuperación de proceso global para fibrinógeno y proteínas purificadas conjuntamente partiendo del crioprecipitado de plasma hasta el eluato MacroPrep™-HQ se muestra en la Figura 5.

La pureza de fibrinógeno que se recuperó de la resina cromatográfica MacroPrep™-HQ era mayor del 95%, tal como se reveló mediante cromatografía HPLC de exclusión por tamaño analítica. Un representante del perfil de HPLC de fibrinógeno analizado en TSKGel™ G4000SWXL (Tosoh Corporation) se muestra en la Figura 6. Tal como se muestra en la Figura 6, el monómero de fibrinógeno se eluye a un tiempo de retención de aproximadamente 17,4 minutos y contribuyó al 96,6% del área pico total, mientras que el dímero de fibrinógeno y/u otras proteínas de alto peso molecular se eluyen a un tiempo de retención de aproximadamente 14,8 minutos.

Se fabricaron lotes de fibrinógeno adicionales a escala piloto (81 kg de equivalente de plasma) siguiendo el proceso descrito en los ejemplos 5 y 6. Las características de las preparaciones de fibrinógeno se proporcionan en la tabla 4.

Ejemplo 7 - Filtración de virus de fibrinógeno purificado

Se examinó la capacidad de filtración a través de un filtro de virus de 20 nm para preparaciones de fibrinógeno obtenidas siguiendo el método del ejemplo 6, siendo la etapa de elución MacroPrep™-HQ usada o bien NaCl 190 mM (21,5mS/cm), NaCl 200 mM (22,5 mS/cm), NaCl 210 mM (23,5 mS/cm) o un tampón NaCl 200 mM que contenía el 1% (p/p) de arginina (25 mS/cm).

El método implicaba formular las preparaciones con el 3% (p/p) de arginina a un pH de aproximadamente 7,5 (la concentración de proteína de las muestras era de aproximadamente 6 g/l). Las preparaciones formuladas se filtraron entonces usando un filtro de 0,1 µm antes de la etapa de filtración de virus. La etapa de filtración de virus se llevó a cabo usando un filtro Pall SV4™ de 47 mm en modo terminal usando una presión constante de 1,8 bar. Los resultados indican que las preparaciones de fibrinógeno obtenidas de la columna MacroPrep™ HQ usando o bien 190 mM, 200 mM o bien 210 mM dieron como resultado características de filtración similares. Por el contrario, la preparación de fibrinógeno eluida de la columna MacroPrep™ HQ usando tampón NaCl 200 mM que contenía el 1% (p/p) de arginina ensució rápidamente el filtro (Figura 7).

Ejemplo 8 - Estudio de estabilidad

La disolución de fibrinógeno purificada recuperada mediante el método descrito en el ejemplo 5 antes se sometió a filtración estéril y a un estudio de estabilidad a lo largo de un periodo de 9/7 semanas a 2°-8°C o 30°C. La preparación de fibrinógeno líquido puesta a 2°-8°C retuvo desde aproximadamente el 90% de su actividad original medida mediante el método Clauss tras el periodo de almacenamiento de 9 semanas. La preparación de fibrinógeno líquido puesta a 30°C retuvo aproximadamente el 70% de su actividad original tras el periodo de almacenamiento de 2 semanas y no perdió más actividad durante al menos 5 semanas. Una reducción adicional en la actividad hasta menos del 60% se observó en la semana 7 de incubación a 30°C. La pérdida de actividad de fibrinógeno a 30°C puede atribuirse probablemente a la desnaturalización térmica, en vez de a una degradación proteolítica, ya que la adición de un inhibidor de proteasa (C1 esterasa) no inhibía la pérdida de actividad de fibrinógeno a lo largo del periodo de almacenamiento de 5 semanas. Se proporciona un resumen de los datos de estabilidad en la Figura 8.

Tabla 3

Etapas de procesamiento	Proteína mg/ml (n=3)		Proteína coagulable (n=3)		Plasminógeno (n=3)		t-PA (n=3)		Factor II (n=3)		Fibronectina (n=3)	
	Conc. (mg/ml)	Recuperación por etapas (%)	Conc. (mg/ml)	Recuperación por etapas (%)	Conc. (ug/ml)	Recuperación por etapas (%)	Conc (ng/ml)	Recuperación por etapas (%)	Conc. (U/ml)	Recuperación por etapas (%)	Conc (mg/m L)	Recuperación por etapas (%)
Crioprecipitado solubilizado	31,0		23,5		65,44		9,00		0,28041		8,15	
Filtrado de crioprecipitado solubilizado - tras el tratamiento con Al(OH) ₃	15,8	81%	11,6	80%	39,04	96%	2,20	39%	0,00057	0,3%	3,47	70%
Precipitado salino de glicina solubilizado	30,3	76%	27,6	95%	45,78	46%	5,55	101%	0,00025	26,0%	3,18	37%
Fracción de caída a través de HEA Hypercel	22,7	93%	20,5	92%	2,20	6%	0,98	22%	0,00008	39%	2,79	97%
Incubación SD y cromatografía Macroprap-HQ	7,4	80%	6,7	79%	0,04	5%	0,13	38%	<0,00002	0%	0,09	8%

5

Tabla 4

N.º de lote	1	2	3	4
% de proteína coagulable	96	94	95	94
tPA por mg de proteína (µg/mg)	12	24	17	21
Plasminógeno por mg de proteína (ng/mg)	5	6	5	6
Factor II por mg de proteína (IU/mg)	3,3 x 10 ⁻⁷	3,9 x 10 ⁻⁷	5,5 x 10 ⁻⁷	9,6 x 10 ⁻⁷

Ejemplo 9 - Reducción de los niveles de proteasa en plasma en una disolución que contiene factor VIII y/o VWF usando HEA Hypercel

10

Este ejemplo demuestra que la etapa de cromatografía HCIC también puede emplearse para reducir las proteasas en preparaciones que contienen factor VIII y/o VWF. El método implicaba clarificar la disolución que contenía fibrinógeno obtenida del ejemplo 4 usando un filtro profundo antes de hacer pasar entonces la disolución clarificada a través de una segunda resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba (HCIC). La etapa de HCIC se hizo funcionar en condiciones para permitir que proteasas tales como plasminógeno se uniesen a la resina, mientras que el factor VIII y VWF podían pasar a través de la resina. En particular, se empaquetó una columna XK 50/30 con 340 ml de resina HEA Hypercel™. La columna se preequilibró en Tris 50 mM pH 6,7. La disolución de fibrinógeno clarificada preparada según el ejemplo 4 se cargó entonces en la columna y se lavó la columna con Tris 50 mM pH 6,7. Se recogió la fracción de caída a través y se determinaron los niveles de factor VIII, VWF, plasminógeno y t-PA (VWF:RCo = factor de von Willebrand-cofactor de ristocetina). Se proporciona un resumen de los resultados

15

20

promedio obtenidos de 4 pases individuales en la tabla 5. Los resultados indican que la etapa de cromatografía HCIC eliminó de manera efectiva proteasas tales como plasminógeno y tPA de la fracción que comprendía el factor VIII y VWF. Además se observaron buenas recuperaciones de factor VIII y VWF.

5

Tabla 5

	Volumen (ml)	Factor VIII (IU/ml)	VWF:RCO (IU/ml)	Plasminógeno (ng/ml)	t-PA (pg/ml)
Pre-HEA Hypercel	3377,7	10,9	11,9	28617,1	2957,4
Post-fracción de caída a través HEA Hypercel	3949,3	8,7	10,6	1874,0	683,5
% de recuperación en la fracción de caída a través		93%	104%	8%	27%

Ejemplo 10 - Estudio comparativo de fibrinógeno purificado a partir de diferentes métodos

10 La preparación de fibrinógeno fabricada según el método descrito en el ejemplo 6 se comparó con preparaciones de fibrinógeno fabricadas mediante los métodos descritos en los documentos WO2001048016, WO2012038410 y WO2013135684.

15 (a) Preparación de fibrinógeno fabricada mediante una realización preferida de los métodos descritos en el documento WO2001048016.

Brevemente, el método implicaba suspender pasta de la fracción I en tampón de extracción (NaCl 0,8 M, EACA (ácido epsilon-aminocaproico) 5 mM, citrato de Na 20 mM, 60 IU/ml de heparina, pH 7,3) (1 g de fracción I con respecto a 8,33 g de tampón de extracción). La disolución se mezcló entonces a 37°C durante 1,5 horas antes de
20 añadir 50 g de una disolución de Al(OH)₃ (Alhydrogel) al 2% por gramo de fracción I (10,8%). Se agitó la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente y entonces se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos desechándose el sedimento. Al sobrenadante tratado con Alhydrogel se le añadió un tampón de glicina/NaCl (glicina 2,1 M, citrato de Na 20 mM, NaCl 3,6 M y CaCl₂ 2,4mM) (ambas disoluciones se preequilibraron hasta 30°C). La adición del sobrenadante al tampón se completó en aproximadamente 4,5 minutos (1 parte de sobrenadante con respecto a
25 2,05 partes de tampón). Entonces se agitó la mezcla durante 20 minutos a 30°C antes de centrifugarse durante 10 minutos a 5010 g (se desechó el sobrenadante). Entonces volvió a solubilizarse el precipitado en tampón D (NaCl 100 mM, CaCl₂ 1,1 mM, citrato de Na 10 mM, tris 10 mM, sacarosa 45 mM, pH 6,9) a temperatura ambiente mezclando durante 2 horas (1/3 del volumen del usado para resuspender la fracción I) (ejemplo 1, secciones 1.1.1-
30 1.1.6, documento WO0148016). La disolución que contenía fibrinógeno resolubilizada se cargó entonces en una columna MacroPrep™ HQ (XK26 con una altura de lecho de 20 cm). La columna se preequilibró con al menos 1,5 volúmenes de columna (CV) de tampón MQ (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, EACA 20 mM, pH 8,0 a 10 ml/min (113 cm/h). Se continuó el equilibrado hasta que la conductividad tras la columna era del 90-110% del tampón preparado. Entonces se cargó la disolución de fibrinógeno en la columna y se lavó la columna con 6 CV de tampón MQ. El fibrinógeno se eluyó como un único pico usando tampón ME (NaCl 500 mM, CaCl₂ 1,1 mM, citrato de Na
35 10 mM, Tris 10 mM y sacarosa 45 mM, pH 7,0). La columna puede regenerarse usando 2CV de NaCl 1 M (ejemplo 2, documento WO2001048016).

(b) Preparación de fibrinógeno fabricada mediante una realización preferida de los métodos descritos anteriormente en los documentos WO2012038410 y WO2013135684.

40 El crioprecipitado, producido a partir de plasma mediante los métodos establecidos, se reconstituyó o solubilizó a aproximadamente pH neutro, se sometió a adsorción con Al(OH)₃ y el gel resultante se eliminó mediante centrifugación. El sobrenadante se inactivó entonces para virus mediante tratamiento con disolvente/detergente (S/D). Los compuestos de S/D, Triton y TnBP se extrajeron con aceite vegetal y la fase acuosa se puso en contacto
45 con Fractogel® EMD-TMAE. Se emplearon condiciones cromatográficas (valor de pH de 6,9-7,1 y una osmolalidad de 570-610 mosmol/l) en las que el fibrinógeno no se unía al gel y por tanto se encontraba en el flujo a través o sobrenadante. La disolución de fibrinógeno no unido se agitó durante aproximadamente 90 minutos tras la adición de glicina (concentración final de 1 mol/l y pH=7,4) en presencia de EDTA 20 mM para precipitar el fibrinógeno. El precipitado que contenía fibrinógeno se separó entonces mediante centrifugación, produciendo una pasta de
50 fibrinógeno intermedia. La pasta de fibrinógeno intermedia se resuspendió en tampón Tris 20 mM (pH= aproximadamente 8,0). La suspensión obtenida se filtró y se sometió entonces a ultra/diafiltración. La disolución que contenía fibrinógeno resultante se cargó entonces en GigaCap Q-650M® y el gel o la resina cromatográfica se preequilibró con el mismo tampón Tris usado para la resuspensión antes de aplicar la disolución de fibrinógeno. Las sustancias unidas de manera holgada se lavaron con el tampón de equilibrado seguido de lavado con un tampón de
55 lavado (citrato de sodio 1,5 g /l, cloruro de sodio 6,0 g/l, ajustado a aproximadamente pH=7,0 y una conductividad de aproximadamente 12,0 mS/cm). Entonces se eluyó el fibrinógeno de la columna cromatográfica con un tampón de

elución (citrato de sodio 1,5 g/1 y glicina 10,0 g/1, ajustado al mismo pH que el tampón de lavado y ajustado con NaCl aproximadamente 7,0 g/1 a la conductividad de 13,1-15 mS/cm.).

5 Las disoluciones que contenían fibrinógeno obtenidas de los métodos descritos en los documentos WO2001048016, WO2012038410 y WO2013135684 se sometieron a prueba para determinar los niveles de proteína total (biuret), fibronectina y plasminógeno. Además, se pusieron muestras en el ensayo de estabilidad a 2-8°C y 30°C.

10 Se proporciona una comparación de las propiedades de las preparaciones de fibrinógeno en la tabla 6. Los resultados del estudio indican que el fibrinógeno fabricado a partir de los métodos descritos en el presente documento contiene niveles menores de plasminógeno en comparación con los otros métodos.

Tabla 6

Preparaciones de fibrinógeno	Método del ejemplo 6	Método del documento WO2001048016	Método de los documentos WO2012038410/ WO2013135684
Fibronectina (µg/mg de proteína)	12	11	0,09
Plasminógeno (ng/mg de proteína)	5	54	791

15

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método de reducción del nivel de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular en una disolución que comprende al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibrinógeno, comprendiendo el método:
- 10 (i) hacer pasar una materia prima que comprende fibrinógeno a través de una resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba en condiciones seleccionadas de modo que al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular presente en la materia prima se une a la resina; y
- 15 (ii) recuperar una disolución que comprende el fibrinógeno que pasa a través de la resina, reduciéndose la concentración de la al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en plasminógeno, activador de plasminógeno tisular en la disolución en al menos el 50% en comparación con la materia prima;
- 20 2.- El método según la reivindicación 1, que comprende además hacer pasar la disolución que comprende el fibrinógeno recuperada en la etapa (ii) a través de una resina de cromatografía de intercambio aniónico.
- 25 3.- El método según la reivindicación 2, en el que la disolución que comprende el fibrinógeno se hace pasar a través de la resina de cromatografía de intercambio aniónico en presencia de NaCl aproximadamente 150 mM a aproximadamente 270 mM.
- 30 4.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que el fibrinógeno se eluye de la resina de cromatografía de intercambio aniónico con un tampón de elución que comprende NaCl desde aproximadamente 150 mM hasta aproximadamente 300 mM.
- 35 5.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la materia prima se somete a una etapa de inactivación viral antes de la etapa (i).
- 6.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la disolución que comprende el fibrinógeno recuperado de la resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba se somete a una etapa de inactivación viral.
- 40 7.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la materia prima es un crioprecipitado de plasma solubilizado.
- 8.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que, antes de la etapa (i), se eliminan o se reducen de la materia prima proteínas dependientes de la vitamina K.
- 45 9.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la materia prima o disolución que comprende el fibrinógeno, que se hace pasar a través de la resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba tiene un pH de desde aproximadamente 6,5 hasta aproximadamente 8,5.
- 50 10.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la resina de cromatografía por inducción de carga hidrófoba comprende un ligando seleccionado del grupo que consiste en mercaptoetilpiridina, n-hexilamina y fenilpropilamina.

FIGURA 1

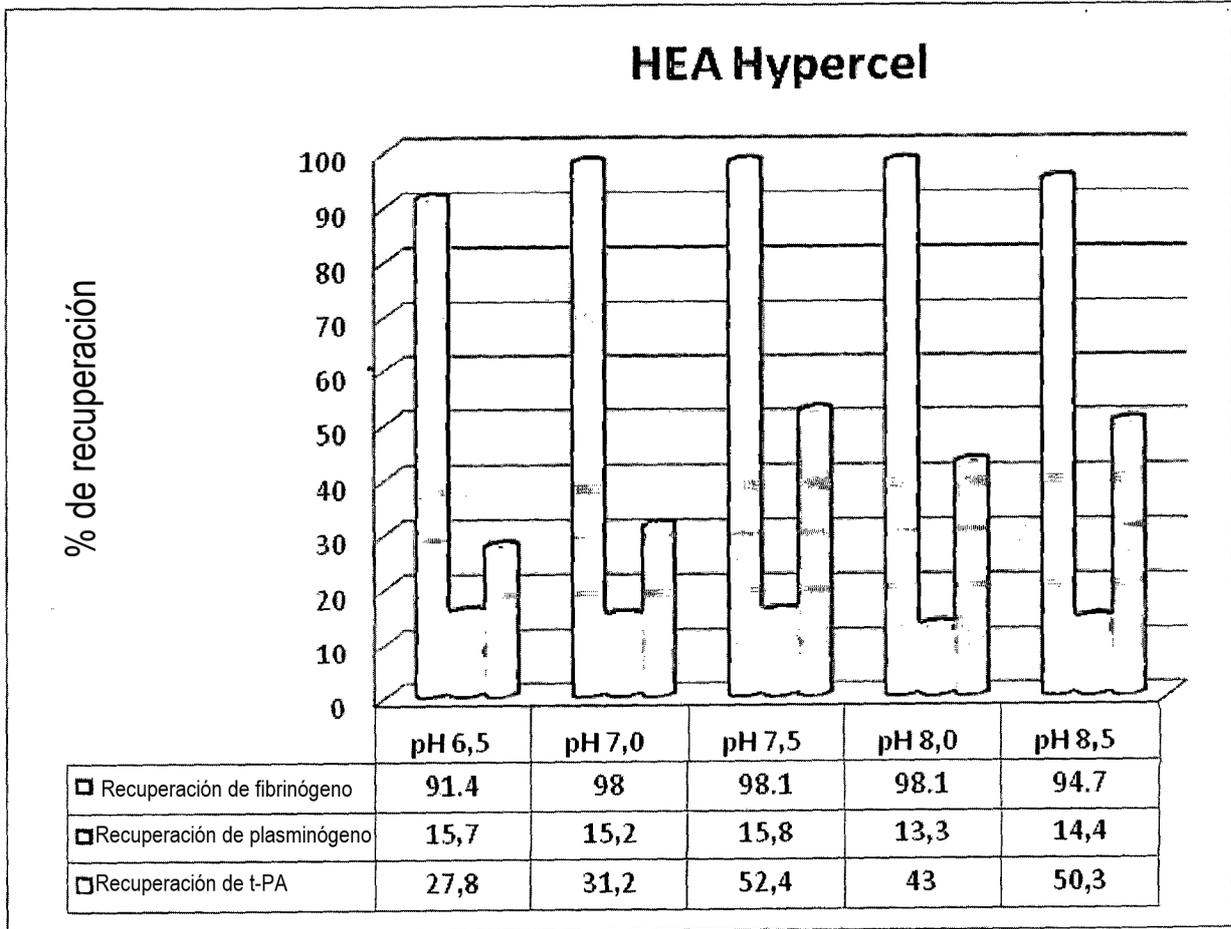


FIGURA 2

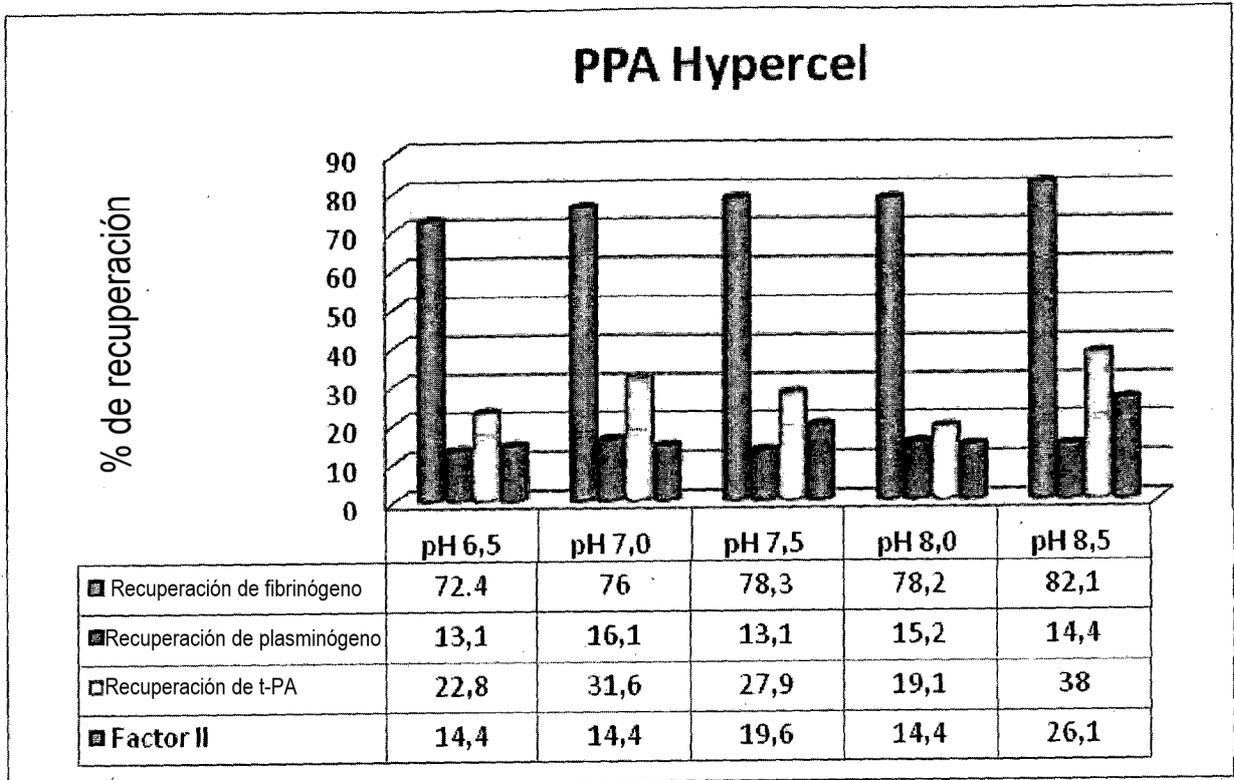


FIGURA 3

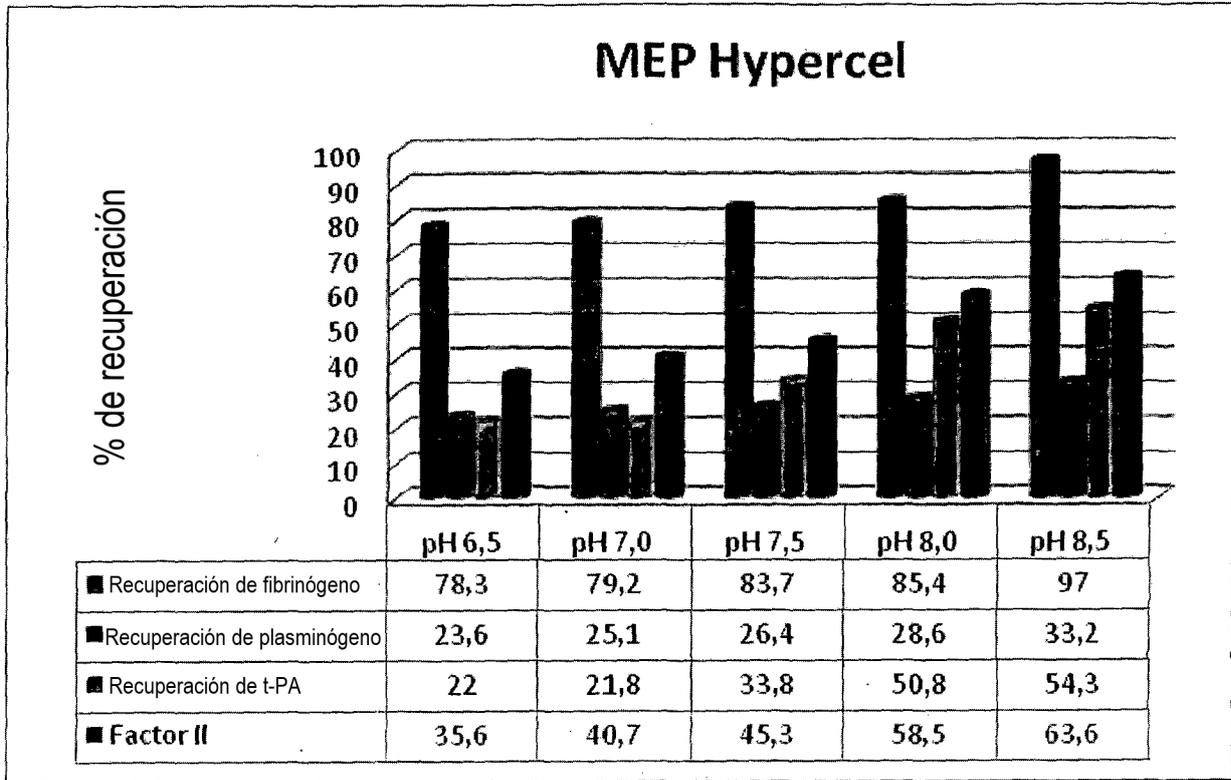


FIGURA 4a

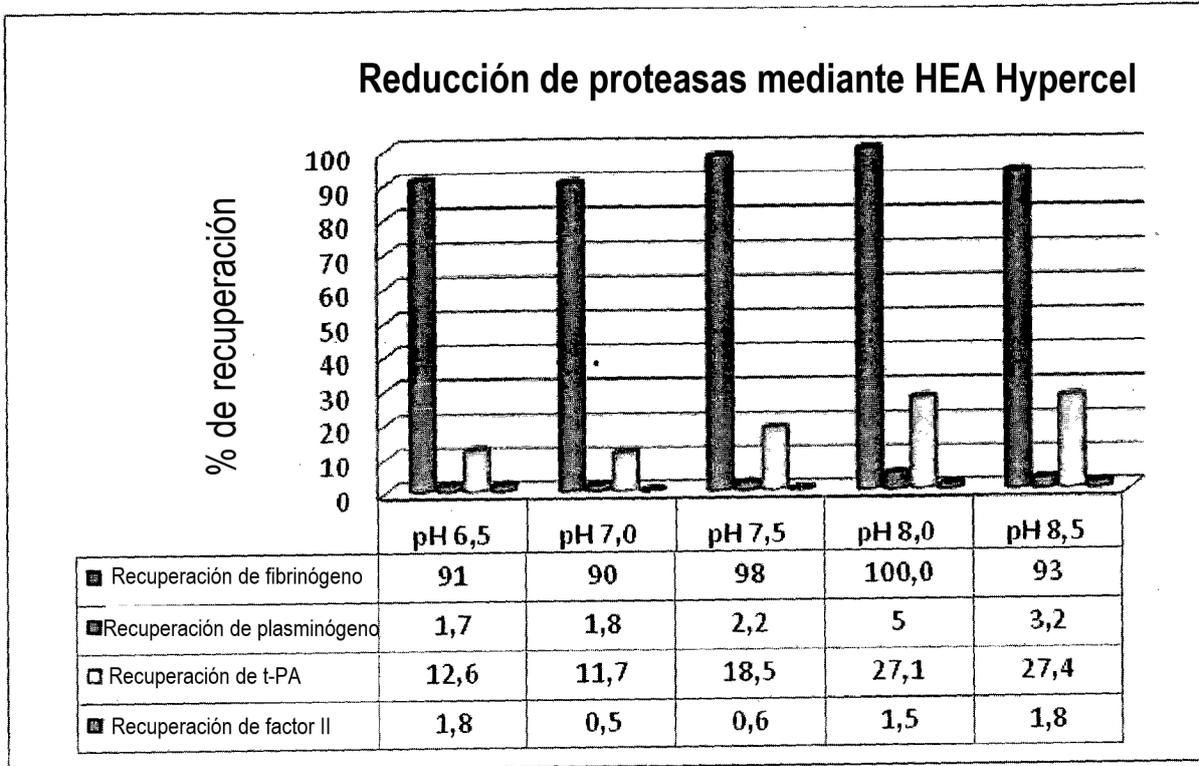


FIGURA 4b

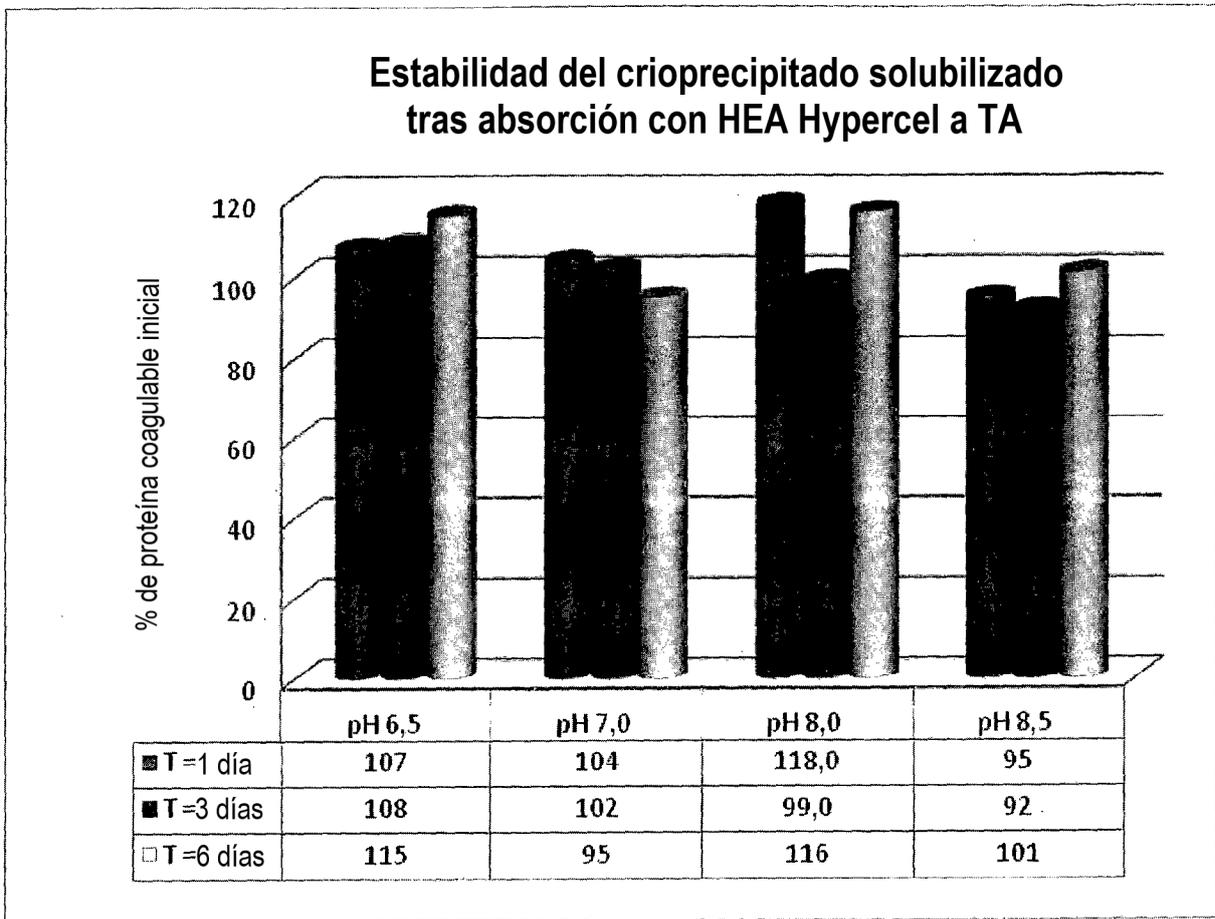


FIGURA 4c

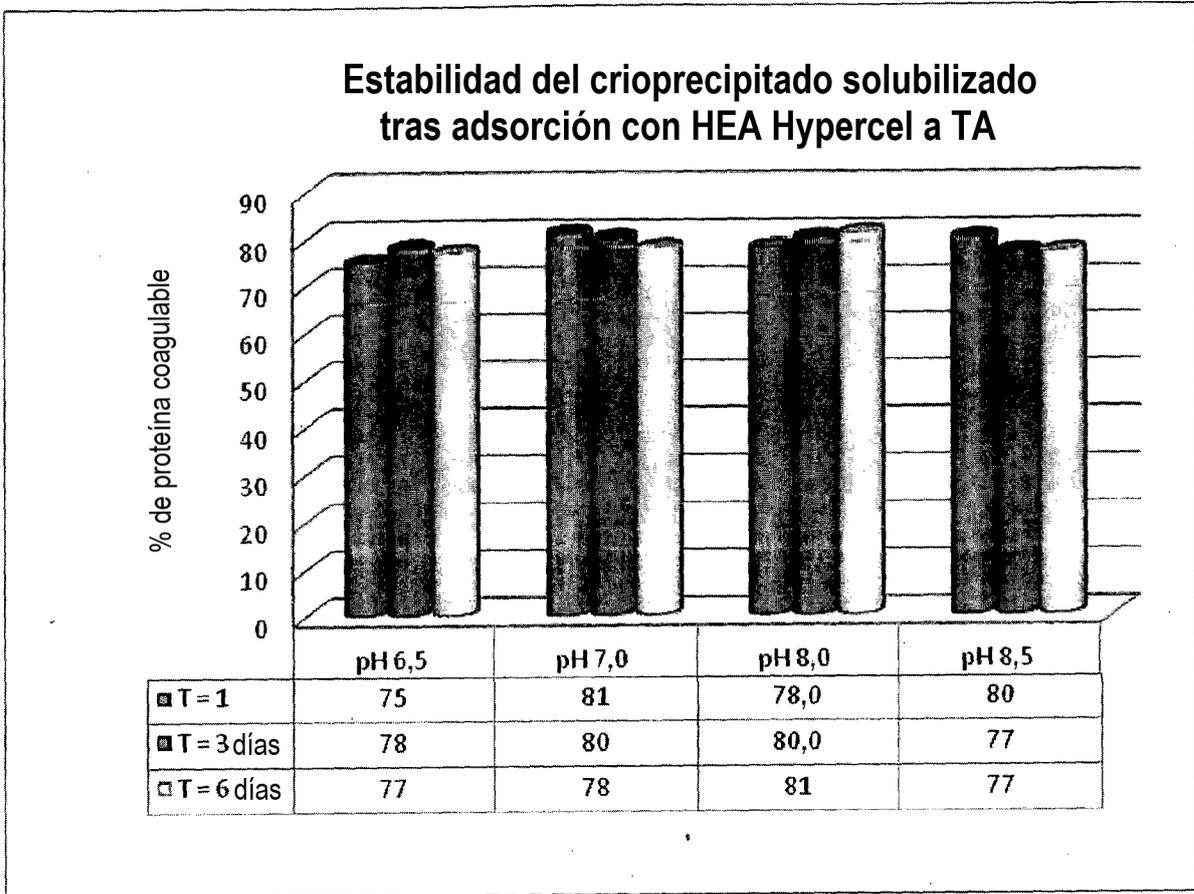


FIGURA 5

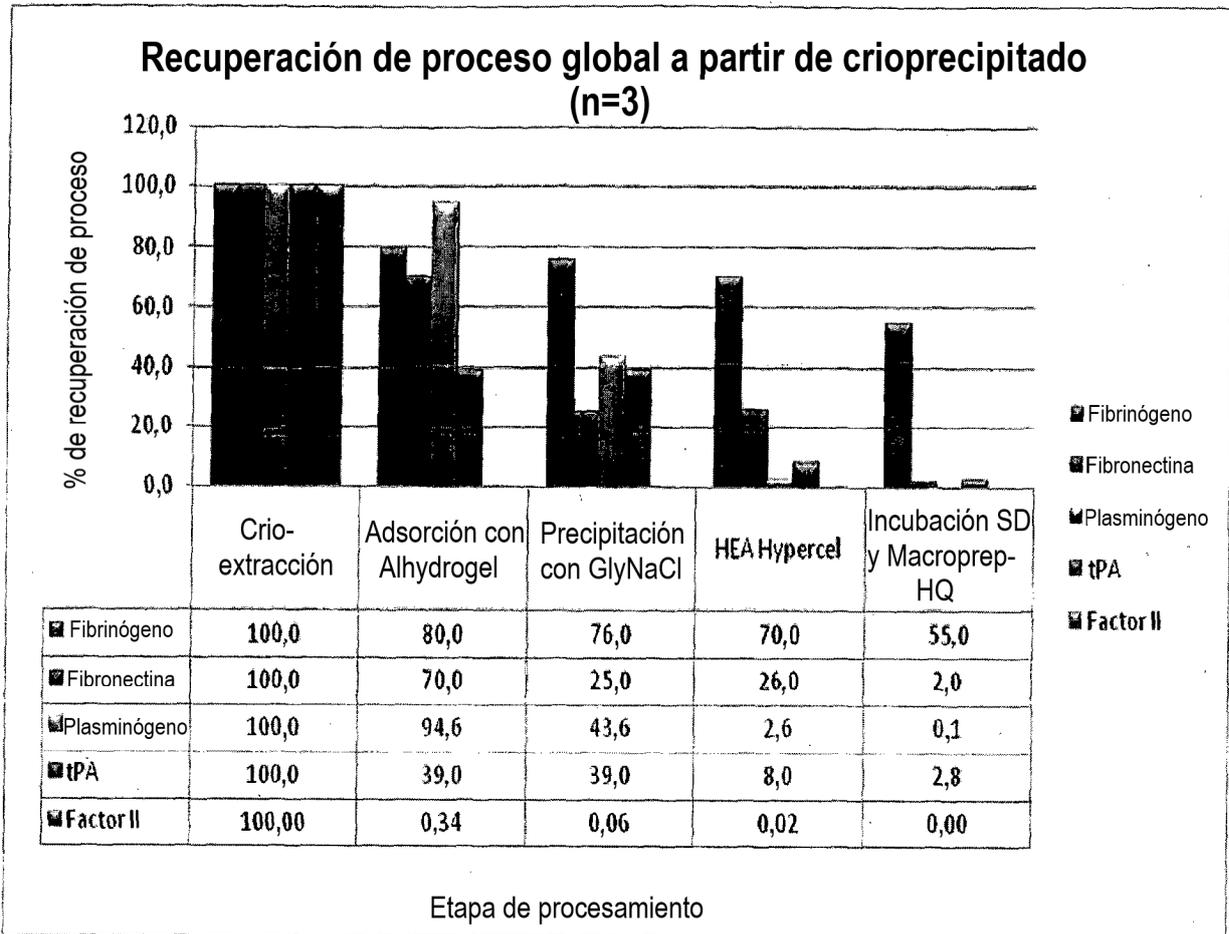
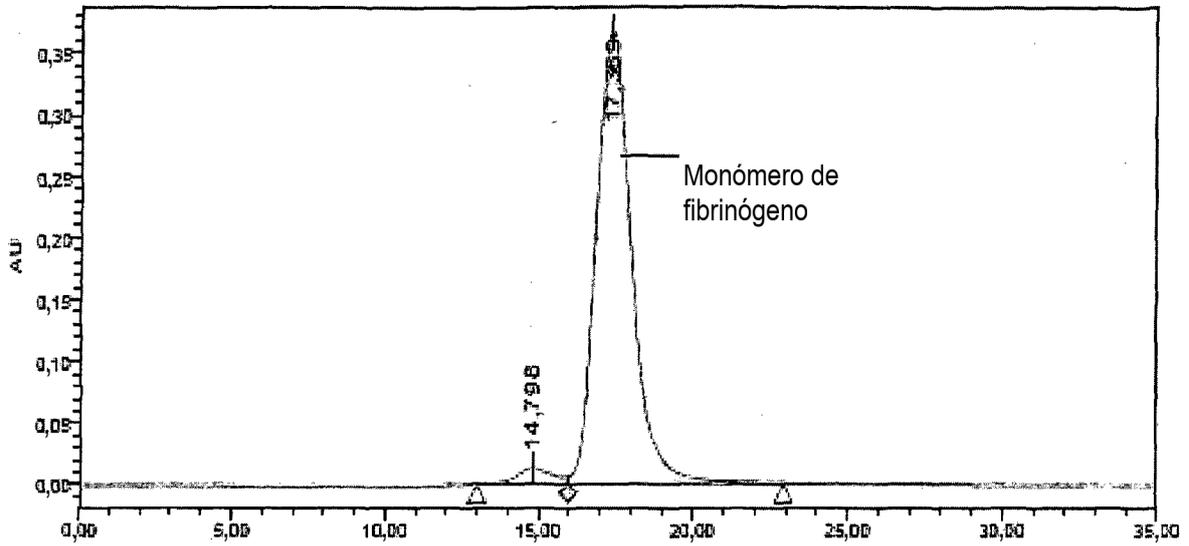


FIGURA 6



Canal procesado : 280NM

	Canal procesado	Tiempo de reten. (min)	Área	% de área	Altura
1	280NM	14,798	1038217	3,42	12701
2	280NM	17,369	29360277	96,58	367205

FIGURA 7

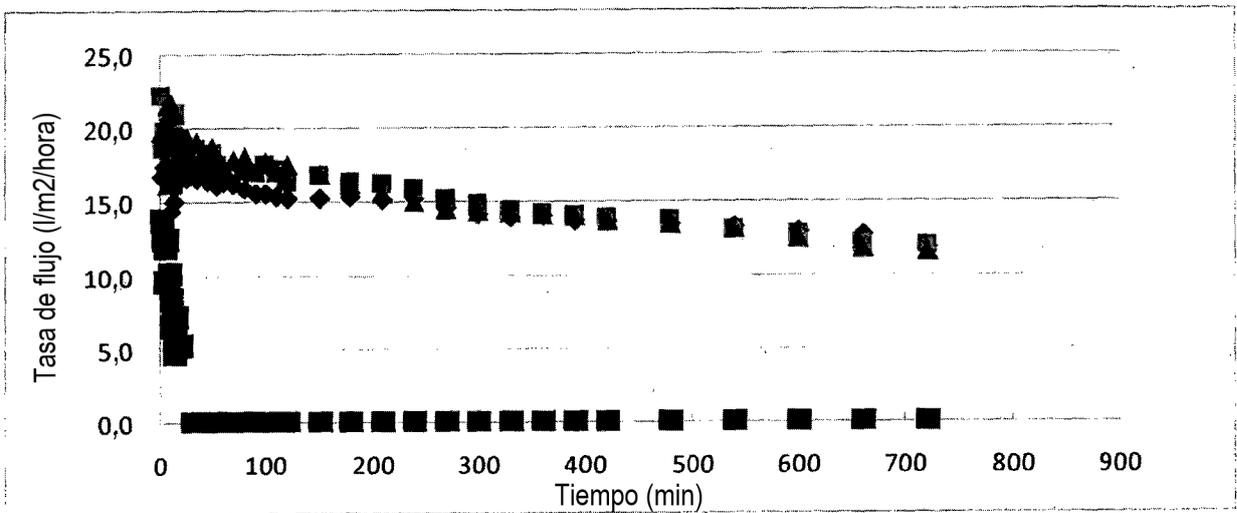


FIGURA 8

