

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 711**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2011 PCT/EP2011/070257**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12066036**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2011 E 11784653 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2640413**

54 Título: **Un proceso para la reducción y/o retirada de FXI y FXIa de soluciones que contienen fichos factores de coagulación**

30 Prioridad:

16.11.2010 EP 10191398

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

20.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SCHULTZ, PETRA;
GRUBER, GERHARD;
BAL, FREDERIC;
MARKS, FRANK y
WINGE, STEFAN**

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 743 711 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 proceso para la reducción y/o la retirada de FXI y FXIa de soluciones que contienen dichos factores de coagulación

5 La presente invención se refiere a un proceso para la reducción y/o la retirada de FXI y FXIa de soluciones que contienen dichos factores de coagulación.

10 Se sabe bien que el factor de coagulación XI (FXI) es una proteína implicada en la coagulación de la sangre y representa una parte de la vía intrínseca de la cascada de coagulación. FXI es el precursor de FXI activado (FXIa), que es el compuesto activo durante la coagulación. Por tanto, es esencial retirar FXIa de las preparaciones farmacéuticas que se aplican por vía intravenosa a los pacientes, ya que dicho FXIa puede iniciar involuntariamente la coagulación y provocar eventos trombóticos que ponen en peligro la vida. Por otra parte, un concentrado de FXI y/o FXIa podría ser beneficioso para pacientes que padecen una enfermedad relacionada con la falta de actividad o la actividad insuficiente de FXI, o para pacientes que experimentan una gran pérdida de sangre donde la coagulación rápida y eficaz es de vital importancia. Dicho concentrado también puede ser beneficioso para pacientes que padecen de anticuerpos inhibidores contra factores de coagulación, tal como en la hemofilia A y B. Esos inhibidores pueden provocar episodios de sangrado, por tanto, los pacientes requieren agentes para respaldar la coagulación y el cierre de la herida.

20 Por tanto, un objetivo de la presente invención es retirar o al menos reducir FXI y/o FXIa de soluciones que contienen FXI y/o FXIa.

25 Se conocen varios métodos para preparar un concentrado de FXI. Bouma y Griffin publicaron en *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 1977, vol. 252, n.º 18, págs. 6432-6437, un proceso para la purificación de FXI a partir de plasma humano mediante cinco etapas cromatográficas. Los materiales cromatográficos utilizados en un orden cronológico son DEAE-Sephadex®, QAE-Sephadex®, SP-Sephadex® (dos veces) y por último Concanavalina A unida a Sepharose®. Todos los tampones utilizados contienen Polybrene® y benzamidina.

30 M. BURNOUF-RADOSEVICH y T. BURNOUF informaron en *TRANSFUSION*, 1992, 32, págs. 861-867, la producción de un liofilizado de FXI por filtración de plasma escaso en crioprecipitado sobre un filtro cargado negativamente (Zeta plus 50S), que adsorbe FXI, elución del FXI adsorbido y cromatografía del eluato sobre una resina de intercambio catiónico (Flujo Rápido de Sulfato-Sepharose®). El FXI eluido se formuló con antitrombina y heparina antes de la liofilización.

35 Hiroshi Mashiko y Hidenobu Takahashi desvelaron en *BIOL. CHEM. HOPPE-SEYLER*, 1994, vol. 375, págs. 481-484, un método de producción para FXI y FXIa porcinos basado en cromatografía de afinidad de cininógeno de alta masa molecular y cromatografía sobre Q-Sepharose®. Para evitar la activación por contacto y superar la digestión proteolítica los inventores añadieron Polybrene® y benzamidina a los tampones utilizados. Los inventores también informaron que no consiguieron purificar FXI mediante cromatografía de afinidad con Heparina-Sepharose®.

45 Otro artículo de Hiroshi Mashiko y Hidenobu Takahashi analizaron en *AGENTS AND ACTIONS SUPPLEMENTS*, (BIRKHAUSER VERLAG, BASILEA, SUIZA), 1992, vol. 38, parte 2, págs. 249-256, un método de producción para FXI y FXIa porcinos basado en cromatografía sobre cininógeno de alta masa molecular, Q-Sepharose® y Proteína A-Superose® con Polybrene® y benzamidina presentes en tampones.

50 Tait y Fujikawa desvelaron en *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 1981, vol. 262, n.º 24, págs. 11651-11656, un método para purificar FXI y precalicreína a partir de plasma humano mediante tres etapas cromatográficas y el uso de Polybrene® y benzamidina en los tampones. Un péptido sintético que representa una parte de la cadena ligera de cininógeno de alto peso molecular se inmovilizó en un vehículo y se usó para aislar precalicreína, FXI y algo de arrastre de IgG de plasma. Se separaron precalicreína y FXI posteriormente mediante cromatografía de heparina-agarosa y, por último, se pulieron por CM-Sephadex® para obtener fracciones aparentemente puras de FXI y precalicreína.

55 Saito *et al.* presentaron en *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION*, vol. 52, págs. 850-861, 1973, un método de purificación para FXI que consiste en la adsorción de plasma sobre Ca₃(PO₄)₂, fraccionamiento de sulfato de amonio múltiple y cromatografía sucesiva sobre QAE-Sephadex® (dos veces), Sephadex®-G150 y SP-Sephadex® con Polybrene® presente para evitar la activación de FXI.

60 Koide *et al.* publicaron un proceso relacionado con el aislamiento de FXI de sangre o plasma sanguíneo con el fin de proporcionar un concentrado de FXI en *BIOCHEMISTRY*, vol. 16, n.º 10, págs. 2279 a 2286, 1977. Durante el proceso desvelado, se retira FXI de una solución de partida usando varias separaciones cromatográficas y numerosas etapas de lavado con grandes volúmenes de tampones de lavado que comprenden Polybrene® y benzamidina.

65

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un proceso para reducir el contenido de FXI y FXIa de una solución que contiene dichas proteínas y, como componente principal, inmunoglobulinas. Esto se consigue mediante la adsorción de dichas proteínas sobre material adsorbente adecuado para cromatografía de afinidad. Dichos materiales adecuados para cromatografía de afinidad están compuestos de polisacáridos, por ejemplo, dextrano, heparina o heparano, unidos al material de la matriz (por ejemplo, zeolitas o polímeros tales como acrilatos y sacáridos), en particular, un gel utilizado para cromatografía de afinidad por heparina, tal como, por ejemplo, Heparina Sepharose^(TM) FF o Toyopearl AF Heparina 650 M^(TM).

La fuente que contiene la solución puede ser cualquier líquido que contenga FXI y FXIa derivado de sangre o plasma sanguíneo o líquidos derivados de procesos biotecnológicos. Son ejemplos conocidos pero no limitantes de dichas soluciones: plasma escaso en crioprecipitado, intermedios del proceso de Cohn (por ejemplo, pasta reconstituida I+II+III) y sus derivados, intermedios del proceso de Kistler-Nitschmann (por ejemplo, precipitado A reconstituido) y sus derivados, o soluciones resultantes de la expresión de proteínas recombinantes, pero también soluciones que están compuestas principalmente de otras proteínas, en las que FXI y FXIa representan impurezas, que pueden ser el caso de soluciones de inmunoglobulina-gamma (IgG).

El proceso para la reducción y/o la retirada de FXI y FXIa de una solución de partida que contiene dichos factores de coagulación y, como componente principal, inmunoglobulinas, comprende las siguientes etapas:

- a) aplicar la solución de partida a una matriz cromatográfica de afinidad en un tampón de carga de una conductividad de 10-18 mS, en la que la heparina o el heparano se unen al material de la matriz;
- b) permitir la adsorción de FXI y FXIa a la matriz cromatográfica en un tampón de una conductividad de 10-18 mS;
- c) separar el líquido privado de FXI y FXIa de la matriz cromatográfica, y
- d) opcionalmente, eluir FXI y FXIa de la matriz cromatográfica con un tampón de elución de fuerza iónica baja a intermedia que contiene de 0,2 a 1,4 NaCl para proporcionar un eluato de FXI y/o FXIa,

en el que el proceso se realiza en ausencia de Polybrene® (bromuro de hexadimetrina) y benzamidina, y en el que el líquido privado de FXI y FXIa separado en la etapa c) se caracteriza por un contenido de FXI de 0,00 a 0,05 UI de FXI/ml y un contenido de FXIa de menos de 5 mU de FXIa/ml.

También es posible modificar la etapa a) en la medida en que los sitios activos de la matriz o el gel ya estén saturados o se les permita saturarse con antitrombina durante la carga de la matriz o el gel con FXI y FXIa.

La adsorción puede realizarse como adsorción discontinua en la que la solución de partida se mezcla con el adsorbente, se agita, y FXI y FXIa cargados sobre el adsorbente se retiran del sobrenadante mediante procesos conocidos como sedimentación, filtración o centrifugación. Un procedimiento alternativo es la compactación del material de adsorción en una columna cromatográfica y la aplicación de la solución de partida para cargar el adsorbente con FXI y FXIa.

En una realización de la invención, pueden usarse adicionalmente silicatos seleccionados entre el grupo de sílice, perlitas, zeolitas o tierra de diatomeas como adsorbentes de FXI y FXIa.

En una realización adicional, puede usarse un medio de adsorción adicional seleccionado entre el grupo de hidróxido de aluminio, hidróxido de óxido de aluminio u óxido de aluminio.

También es posible combinar una adsorción preformada en modo discontinuo, por ejemplo, con tierra de diatomeas o hidróxido de aluminio como material de adsorción con una adsorción realizada en una columna cromatográfica con Heparina Sepharose^(TM) como adsorbente.

En otra realización más de la invención, se realiza una adsorción sobre heparina o heparano unidos a un material de matriz después de que el material cromatográfico se precondicione con Antitrombina-III.

El adsorbente cargado se lava cuidadosamente con un tampón de lavado para evitar la desorción de FXI y/o FXIa y la solución de lavado resultante puede añadirse al flujo continuo y/o un sobrenadante que se ha de procesar adicionalmente, y para optimizar la recuperación de otros compuestos de interés, tales como inmunoglobulinas, en particular, IgG, en esta solución agotada en FXI/FXIa. Una solución agotada en FXI/FXIa procesada sobre Heparina Sepharose^(TM) normalmente contiene de 0,00 a 0,05 UI de FXI/ml. El contenido de FXIa expresado en unidades internacionales (UI) de una solución agotada de este tipo es normalmente inferior a 5 mU de FXIa/ml, incluso más en particular de 0,0 a 1,0 mU de FXIa/ml.

El procesamiento adicional de la solución agotada en FXI/FXIa puede incorporar una o más etapas de inactivación de virus, ejemplos dados son el tratamiento con disolvente/detergente (tratamiento D/D), radiación UV, pasteurización, incubación a pH bajo, precipitación de caprilato o nanofiltración. Otras etapas incluyen etapas cromatográficas, concentración para obtener un concentrado de un compuesto farmacéuticamente activo,

formulación y relleno, que se conocen a partir de la fabricación de diversas proteínas tales como inmunoglobulinas, en particular, IgG, albúmina, fibrinógeno, antitrombina o alfa-1-antitripsina, y son obligatorias con el fin de obtener composiciones farmacéuticas y dependen del producto que se ha de producir.

5 Pueden eluirse FXI y FXIa a partir del adsorbente cargado, en particular, si el adsorbente es un gel de cromatografía de afinidad con heparina o heparano unidos a la matriz. La elución de FXI y FXIa a partir de un gel de cromatografía de afinidad se realiza con un tampón de elución que consiste en NaCl 0,2-1,4 M, en particular, NaCl 0,25-1,0 M, incluso más particular NaCl 0,25-0,5 M y fosfato 0,003-0,03 M o fuerza iónica equivalente. Por tanto, en la solución
10 obtenida que contiene FXI y FXIa también pueden inactivarse los virus mediante los métodos mencionados anteriormente y puede concentrarse mediante ultra/diafiltración para obtener un concentrado que contenga FXI y FXIa. Dicho concentrado puede formularse adicionalmente con adyuvantes para obtener una composición farmacéutica capaz de tratar enfermedades relacionadas con la falta o inactividad de FXI o FXIa.

15 Fue sorprendente encontrar niveles de FXI y FXIa del efluente de un gel de cromatografía de heparina por debajo del límite de detección de dichas proteínas, aunque se permitió la penetración de la antitrombina. Se esperaba que FXI y FXIa hubieran sido reemplazados por antitrombina, en particular la isoforma antitrombina- β , ya que se sabe que se une fuertemente a geles de afinidad de heparina y heparano. Fue incluso más sorprendente que fuera posible eluir selectivamente FXI y FXIa del gel de afinidad de heparina saturado con antitrombina con tampones de elución de fuerza iónica baja a intermedia, que contienen esencialmente NaCl 0,2-1,4 M, mientras que es necesario
20 eluir antitrombina-III (AT-III) con tampones de mayor fuerza iónica, que contienen esencialmente NaCl más de 1,5 M, en particular NaCl a aproximadamente 2,0 M. Esta característica permite la elución separada de FXI/FXIa seguida de la elución de AT-III o la co-elución de una mezcla que contiene FXI, FXIa y AT-III cuando se eluye con un tampón de fuerza iónica suficientemente alta para eluir también AT-III.

25 Fue incluso más sorprendente encontrar innecesaria la adición de Polybrene® y benzamidina a los tampones, como enseña en general la bibliografía de la técnica anterior para evitar la activación por contacto y superar la digestión proteolítica.

30 Un objetivo de la presente invención se realiza con la mejor ventaja mediante el precondicionamiento de geles cromatográficos de afinidad con dextrano, heparina o heparano unidos al material de la matriz con antitrombina-III (AT-III). El precondicionamiento puede realizarse de manera que los sitios activos del material cromatográfico estén saturados con AT-III. Este procedimiento es especialmente beneficioso ya que la capacidad de unión del gel de afinidad para FXI y FXIa mejora y la unión de otros factores de coagulación está impedida o al menos obstaculizada en alto grado. Por tanto, es posible retirar FXI y FXIa selectivamente de las proteínas acompañantes y obtener una
35 solución de FXI y FXIa desprovista de otros factores de coagulación después de la elución a partir del gel de afinidad.

También se desvela en el presente documento un concentrado de un componente farmacéuticamente activo que puede obtenerse mediante el proceso de la invención, así como una composición farmacéutica obtenida del mismo.

40 En el concentrado del componente farmacéuticamente activo, el componente farmacéuticamente activo es IgG.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención proporciona un proceso para reducir el contenido de FXI y FXIa de una solución que contiene dichas proteínas y, como componente principal, inmunoglobulinas. Esto se consigue mediante la adsorción de dichas proteínas sobre materiales seleccionados entre materiales de adsorción adecuados para cromatografía de afinidad, en particular, un gel utilizado para cromatografía de afinidad por heparina o heparano, tal como, por ejemplo, Heparina Sepharose FF o Toyopearl AF Heparina 650 M^(TM).

50 La fuente que contiene la solución puede ser cualquier líquido que contenga FXI y FXIa derivado de sangre o plasma sanguíneo o líquidos derivados de procesos biotecnológicos. Son ejemplos conocidos pero no limitantes de dichas soluciones, plasma escaso en crioprecipitado, intermedios del proceso de Cohn (por ejemplo, pasta reconstituida I+II+III) y sus derivados, intermedios del proceso de Kistler-Nitschmann (por ejemplo, precipitado A reconstituido) y sus derivados o soluciones resultantes de la expresión de proteínas recombinantes, pero también soluciones que están compuestas principalmente de otras proteínas, en las que FXI y FXIa representan impurezas, que pueden ser
55 el caso de soluciones de inmunoglobulina-gamma (IgG).

60 El proceso para la reducción y/o la retirada de FXI y FXIa de soluciones que contienen dichos factores de coagulación y, como componente principal, inmunoglobulinas, comprende las siguientes etapas:

- a) aplicar la solución de partida a una matriz cromatográfica de afinidad en un tampón de carga de una conductividad de 10-18 mS, en la que la heparina o el heparano se unen al material de la matriz;
- b) permitir la adsorción de FXI y FXIa a la matriz cromatográfica en un tampón de una conductividad de 10-18 mS;
- c) separar el líquido privado de FXI y FXIa de la matriz cromatográfica, y

d) opcionalmente, eluir FXI y FXIa de la matriz cromatográfica con un tampón de elución de fuerza iónica baja a intermedia que contiene de 0,2 a 1,4 NaCl para proporcionar un eluato de FXI y/o FXIa,

en el que el proceso se realiza en ausencia de Polybrene® (bromuro de hexadimetrina) y benzamidina, y en el que el líquido privado de FXI y FXIa separado en la etapa c) se caracteriza por un contenido de FXI de 0,00 a 0,05 UI de FXI/ml y un contenido de FXIa de menos de 5 mU de FXIa/ml.

También es posible modificar la etapa a) en la medida en que los sitios activos de la matriz o el gel ya estén saturados o se les permita saturarse con antitrombina durante la carga de la matriz o el gel con FXI y FXIa.

Un procedimiento alternativo es la compactación del material de adsorción en una columna cromatográfica y la aplicación de la solución de partida para cargar el adsorbente con FXI y FXIa.

En una realización de la invención, la tierra de diatomeas puede usarse adicionalmente como adsorbentes de FXI y FXIa.

Las etapas a) y b) se realizan cargando las proteínas en un tampón con una conductividad de 10-18 mS, en particular con una conductividad de 14-17 mS, sobre la resina cromatográfica (Heparina-Sepharose™ FF). El adsorbente cargado se lava cuidadosamente con un tampón de lavado de la misma conductividad para evitar la desorción de FXI y/o FXIa y la solución de lavado resultante puede añadirse al flujo continuo y/o un sobrenadante que se ha de procesar adicionalmente, y para optimizar la recuperación de IgG presente en el flujo continuo como solución agotada en FXI/FXIa. La solución agotada en FXI/FXIa procesada sobre Heparina Sepharose™ normalmente contiene de 0,00 a 0,05 UI de FXI/ml. El contenido de FXIa expresado en unidades internacionales (UI) de una solución agotada de este tipo es normalmente inferior a 5 mU de FXIa/ml, incluso más en particular de 0,0 a 1,0 mU de FXIa/ml.

El procesamiento adicional de la solución agotada en FXI/FXIa puede incorporar una o más etapas de inactivación de virus, son ejemplos dados el tratamiento con disolvente/detergente (tratamiento D/D), como se desvela en el documento EP-A-131 740, radiación UV, pasteurización, incubación a pH bajo, precipitación de caprilato o nanofiltración. Otras etapas incluyen etapas cromatográficas, concentración para obtener un concentrado de un compuesto farmacéuticamente activo, formulación y relleno, que se conocen a partir de la fabricación de diversas proteínas tales como inmunoglobulinas, en particular, IgG, albúmina, fibrinógeno, antitrombina o alfa-1-antitripsina, y son obligatorias con el fin de obtener composiciones farmacéuticas y dependen del producto que se ha de producir.

FXI y FXIa pueden eluirse del adsorbente cargado con un tampón de elución que consiste en NaCl 0,36 M y fosfato 0,01 M. De este modo, en la solución que contiene FXI y FXIa también pueden inactivarse los virus mediante los métodos mencionados anteriormente y puede concentrarse por ultra/diafiltración para obtener un concentrado que contenga FXI y FXIa. Dicho concentrado puede formularse adicionalmente con adyuvantes para obtener una composición farmacéutica capaz de tratar enfermedades relacionadas con la falta o inactividad de FXI o FXIa.

Ejemplos

Ensayo de actividad de Factor XIa

Un factor de coagulación recombinante IX (desprovisto de FIXa) se activa a FIXa por FXIa presente en la muestra. En presencia de fosfolípidos y iones de calcio, FIXa forma un complejo enzimático con FVIII:C activado por trombina que está en exceso en la solución de ensayo. Este complejo enzimático posteriormente activa FX, que también está presente en la solución de ensayo, a Factor Xa (FXa). La cantidad generada de FXa puede medirse mediante sustratos disponibles en el mercado y es directamente proporcional a la concentración de FXIa en la muestra. La cuantificación se realiza mediante comparación con una curva de calibración.

Se ha de mencionar que este ensayo también indica las actividades de FIXa y FXa cuando se miden muestras de etapas tempranas del proceso de fraccionamiento de plasma, tales como el plasma escaso en crioprecipitado. Por tanto, es comprensible que las actividades resumidas de FXIa, FIXa y FXa se indiquen para dichas muestras, con el requisito previo de que FIXa y FXa estén presentes en la muestra.

Ejemplo 1:

El material de partida se procesó sobre Heparina Sepharose FF compactada en una columna para permitir la adsorción de FXI y FXIa sobre el material cromatográfico. El flujo continuo que contenía IgG se puso en contacto con Hyflo, es decir, tierra de diatomeas, se centrifugó para retirar Hyflo cargado y el sobrenadante que contenía IgG se procesó posteriormente a la pasta intermedia I+II+III. La reconstitución del intermedio producido de este modo reveló 0,02 UI de FXI/ml y menos de 1 mU de FXIa/ml.

Ejemplo 2:

La pasta I+II+III se produjo de la misma manera que en el Ejemplo 1 con la excepción de la omisión de la captura de FXI/FXIIa sobre tierra de diatomeas. La determinación de FXI y FXIIa reveló un contenido de 0,05 UI de FXI/ml y 3,5 mU de FXIIa/ml.

- 5 Las tablas 1-3 representan los resultados analíticos de las muestras antes y después de la cromatografía en la que las ejecuciones 2-5 se realizaron con una carga reducida de material de partida para el gel de heparina en comparación con la ejecución 1.

Tabla 1: Análisis del material de partida.

Muestra A - Material de partida	Carga de columna reducida				
	ejecución 1	ejecución 2	ejecución 3	ejecución 4	ejecución 5
IgG [g/l]	7,12	6,94	6,65	5,47	7,02
Factor XI [UI/ml]	1,03	1,00	1,00	0,94	0,92
Factor XIIa [mU/ml]	2,5	1,6	1,6	1,9	1,6

10

Tabla 2: Análisis de muestras de varios experimentos de acuerdo con los Ejemplos 1 (ejecución 1, ejecución 4 y ejecución 5) y 2 (ejecución 2 y ejecución 3).

Muestra B - después de cromatografía sobre Heparina Sepharose	Carga de columna reducida				
	ejecución 1	ejecución 2	ejecución 3	ejecución 4	ejecución 5
IgG [g/l]	6,42	6,5	6,38	5,66	6,95
Factor XI [UI/ml]	0,05	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Factor XIIa [mU/ml]	3,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0

Tabla 3: Análisis de muestras de varios experimentos de acuerdo con el Ejemplo 1

Muestra C - después del tratamiento con Heparina Sepharose y Hyflo	Carga de columna reducida				
	ejecución 1	ejecución 2	ejecución 3	ejecución 4	ejecución 5
IgG [g/l]	4,79	-	-	4,98	4,43
Factor XI [UI/ml]	0,02	-	-	< 0,01	< 0,01
Factor XIIa [mU/ml]	< 1,0	-	-	< 1,0	< 1,0

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para la reducción y/o la retirada de FXI y FXIa de una solución de partida que contiene dichos factores de coagulación y, como componentes principales, inmunoglobulinas, que comprende las siguientes etapas:
- 10 a) aplicar la solución de partida a una matriz cromatográfica de afinidad en un tampón de carga de una conductividad de 10-18 mS, en la que la heparina o el heparano se unen al material de la matriz;
- b) permitir la adsorción de FXI y FXIa a la matriz cromatográfica en un tampón de una conductividad de 10-18 mS;
- c) separar el líquido privado de FXI y FXIa de la matriz cromatográfica, y
- d) opcionalmente, eluir FXI y FXIa de la matriz cromatográfica con un tampón de elución de fuerza iónica baja a intermedia que contiene de 0,2 a 1,4 NaCl para proporcionar un eluato de FXI y/o FXIa,
- 15 en el que el proceso se realiza en ausencia de Polybrene® (bromuro de hexadimetrina) y benzamidina, y en el que el líquido privado de FXI y FXIa separado en la etapa c) se caracteriza por un contenido de FXI de 0,00 a 0,05 UI de FXI/ml y un contenido de FXIa de menos de 5 mU de FXIa/ml.
- 20 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los sitios activos del gel de cromatografía de afinidad ya están saturados o se les permite saturarse con antitrombina.
3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el proceso comprende una adsorción realizada en modo discontinuo con tierra de diatomeas como material de adsorción.
- 25 4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que se usa un medio de adsorción adicional seleccionado entre el grupo de hidróxido de aluminio, hidróxido de óxido de aluminio u óxido de aluminio.
5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se realiza una adsorción sobre heparina o heparano unidos al material de la matriz después de que el material de la matriz se preacondicione con Antitrombina-III.
- 30 6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la solución de partida contiene principalmente inmunoglobulina-y.
- 35 7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el líquido privado de FXI y FXIa se somete adicionalmente a al menos una etapa de inactivación de virus seleccionada entre tratamiento con disolvente/detergente, radiación UV, pasteurización, incubación a pH bajo, precipitación de caprilato o nanofiltración para obtener una solución con virus inactivados privada de FXI y FXIa.
- 40 8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que, el líquido con virus opcionalmente inactivado, privado de FXI y FXIa, se concentra para obtener un concentrado de un componente farmacéuticamente activo, que se formula opcionalmente para obtener una composición farmacéutica.
9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que
- 45 (i) después de la etapa c) el material de matriz se lava con un tampón con una conductividad de 10-18 mS y el flujo continuo de la etapa (a) y el efluente del procedimiento de lavado se combina con el líquido privado de FXI y FXIa y se procesa adicionalmente con al menos una etapa de inactivación de virus que emplea fosfato de tri-N-butilo y un detergente;
- 50 (ii) seguido de una etapa de concentración; y
- (iii) opcionalmente, formulación del concentrado obtenido que contiene inmunoglobulina-y.
10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que FXI y FXIa se eluyen de la matriz cromatográfica con un tampón de elución que consiste en NaCl 0,36 M y fosfato 0,01 M.
- 55 11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el eluato de FXI y FXIa se somete a una etapa de inactivación de virus.
- 60 12. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el eluato de FXI y FXIa se concentra, en particular mediante ultra/diafiltración, para obtener un concentrado que contiene FXI y FXIa.