

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No.

05-7426

54. TITULO

PROCESO PARA PRODUCIR UNA PREPARACION DE TROMBINA CON VIRUS

INACTIVADOS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

C12N9/74

71. SOLICITANTE

NATIONAL BLOOD AUTHORITY

DOMICILIO

WATFORD, HERTFORDSHIRE, REINO UNIDO

74. APODERADO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

202099



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación: 05887426 00000000

Folios: 141

Fecha (IMP): 2005-01-20 16:46:45

Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NNCI 411 PRESENTIN

Desconexión: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 10-feb-2005

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: NATIONAL BLOOD AUTHORITY

Dirección: Oak House, Reeds Crescent, Watford,
Hertfordshire WD1 1QH, Reino Unido

Nacionalidad o Domicilio: Reino Unido

Lugar de Constitución: Reino Unido

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Cra. 7 No. 16-56 Piso 9

Teléfono: 380-2200

Fax: 380-2700

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número 80.410.337 TP 57492

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Caroline Connolly, Christopher Hardway, David Evans, Peter Feldman

Dirección: Research and Development, Glasgow Royal Infirmary, 4th Floor Walton Building
84 Castle Street Glasgow, G4 0SF, GB; Bio Products Laboratory, Dagger Lane, Elstree,
Hertfordshire WD6 3BX, GB; Bio Products Laboratory, Dagger Lane, Elstree, Hertfordshire
WD6 3BX, GB; Bio Products Laboratory, Dagger Lane, Elstree, Hertfordshire WD6 3BX,
Reino Unido (Respectivamente)

Nacionalidad o Domicilio: Reino Unido (Respectivamente)

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB2003/002942 Fecha 07-07-2003

Publicación Internacional No. WO 2004/007707 A1 Fecha 22-01-2004

Título (54): PROCESO PARA PRODUCIR UNA PREPARACIÓN DE TROMBINA CON VIRUS
INACTIVADOS

7 Clasificación Internacional (51)

8 Prioridad

SI ☒NO ☐(33) País de
Origen

GB

(32) Fecha

10-07-2002

(31) Número de Solicitud

0216002.6

9 Comprobante de pago No. 51654869

Fecha 28-01-2005

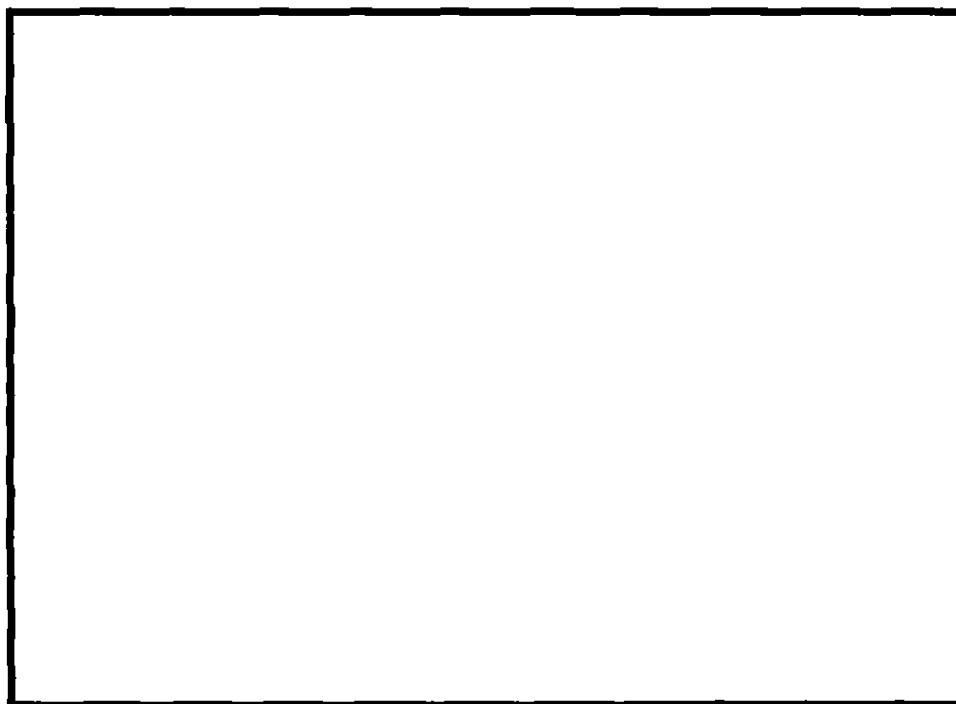
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$443.000
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☒ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: Tarjeta de propietarios.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12. Solicito la concesión de la patente:

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMENTO

FIRMA:

CIC: 80410337 de Usan en: IPP 157492 del OSIA

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

32

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800174089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 4,849
FECHA : ENERO 24 DE 2005

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05007426 00000000 Folios: 141
Fecha (AND): 2005-01-28 16:46:45
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTO
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

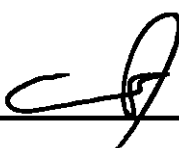
***** CONSIGNACION *****

REPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	21741640	24/01/2005	20,360,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
	TOTAL :	\$ 443,000.00

SOM: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
22 January 2004 (22.01.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/007707 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 38/36, G01N 33/86, A61K 38/48

C12N 9/74.

(74) Agent: FRANK, B., Dehn & Co.: 179 Queen Victoria
Street, London EC4V 4EL (GB).

(21) International Application Number:
PCT/GB2003/002942

(22) International Filing Date: 7 July 2003 (07.07.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0216002.6 10 July 2002 (10.07.2002) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): NA-
TIONAL BLOOD AUTHORITY [GB/GB]; Oak House,
Reeds Crescent, Watford, Hertfordshire WD1 1QH (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): CONNOLLY,
Caroline [GB/GB]; West Research Office, Administration
Building, Western Infirmary, Glasgow G11 6NT (GB).
HARDWAY, Christopher [GB/GB]; Bio Products Lab-
oratory, Dagger Lane, Elstree, Hertfordshire WD6 3BX
(GB). EVANS, David [GB/GB]; Bio Product Laboratory,
Dagger Lane, Elstree, Hertfordshire WD6 3BX (GB).
FELDMAN, Peter [GB/GB]; Bio Products Laboratory,
Dagger Lane, Elstree, Hertfordshire WD6 3BX (GB).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (util-
ity model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (util-
ity model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE
(utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK (utility model), SK, SL, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING A VIRUS-INACTIVATED THROMBIN PREPARATION

(57) Abstract: A method for the preparation of virus-inactivated thrombin comprising solvent-detergent virus inactivation of a solu-
tion comprising prothrombin and factor X, loading the virus inactivated prothrombin and factor X onto an anion exchange medium,
washing the medium to remove the reagents used for the solvent-detergent virus inactivation, and activating the prothrombin on the
medium to form thrombin by the addition of metal ions, preferably calcium ions. The thrombin is then preferably selectively eluted
from the anion exchange medium.

WO 2004/007707 A1

5
X

PROCESS FOR PRODUCING A VIRUS- INACTIVATED THROMBIN PREPARATION

5 The present invention relates to processes for the preparation of virus inactivated thrombin, and to the products prepared by these processes.

Thrombin is a multifunctional plasma protease generated in the blood stream through activation of its inactive precursor, prothrombin (also known as factor 10 II). Prothrombin is itself activated by the action of activated factor X (factor Xa). One of the main functions of thrombin in blood plasma is to convert soluble fibrinogen into insoluble fibrin in the final step of the blood clotting cascade. The fibrin monomers 15 produced by the action of thrombin cluster together and are then cross linked to form a blood clot. Thrombin is used in therapy both alone and in combination with fibrinogen in the so-called fibrin sealants to achieve haemostasis, to seal wounds and for the controlled 20 adhesion of tissue.

For all clinical applications, it is important to have highly pure thrombin in order to minimise any undesirable side effects resulting from, for example, the presence of other proteases or clotting factors, or 25 other contaminating components. In addition, it is highly desirable that thrombin for clinical use, in particular if it is derived from human or animal sources, is treated to inactivate any blood-borne viruses which may be present, for example hepatitis 30 viruses or HIV. Various methods of virus inactivation are known in the art, including pasteurisation, dry heat treatment and solvent-detergent treatment (Pathogen Inactivation of labile blood products, Council of Europe Expert Committee in Blood Transfusion Study Group on 35 Pathogen Inactivation in Labile Blood Products, *Transfusion Medicine*, 2001, 11, 149-175). It is also desirable that other pathogens are removed or reduced,

6
X

for example the causative agents of Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE), currently believed to be prions.

5 Dry heat treatment is known to be effective for the inactivation of both enveloped and some non-enveloped viruses, whilst solvent-detergent treatment is known to be effective for the inactivation of enveloped (i.e. lipid coated) viruses such as hepatitis B. Solvent-detergent treatment is now a commonly used
10 method for virus inactivation of blood products intended for clinical use.

In the past, the activation of prothrombin to thrombin was often brought about by the addition of calcium ions and thromboplastin (factor III). The
15 thromboplastin would be derived from human or animal sources and was therefore a source of possible contamination of the final product.

US 5,304,372 discloses a process for the preparation of a human thrombin concentrate from the
20 PPSB fraction of plasma. The process comprises activation of the prothrombin in the PPSB fraction to produce thrombin by the addition of calcium chloride, followed by solvent-detergent treatment on the resulting product to inactivate viruses. According to US
25 5,304,372 the solvent-detergent treatment cannot be carried out on the PPSB starting material because it would eliminate other factors such as phospholipids necessary for the activation reaction of prothrombin to thrombin.

30 EP-A-0,378,798 discloses a process for the preparation of thrombin which comprises absorbing factor II from plasma or plasma fractions onto a solid carrier, activating the factor II on the solid carrier to thrombin and then eluting the thrombin.

35 US 5,714,370 discloses the preparation of thrombin from virus-inactivated prothrombin using coagulatively active salts to effect the activation of the prothrombin

X
7

to thrombin. The only method disclosed for the virus-inactivation of the prothrombin is heat treatment.

The 1993 Annual Report of the Dr. Karl Landsteiner Foundation on research at CLB (the Central Laboratory of the Netherlands Red Cross blood transfusion service) also reported on page 10 that activation of solvent-detergent treated prothrombin to form thrombin with calcium ions was only successful in the presence of added phospholipids.

It would be advantageous to provide a method for the preparation of thrombin from prothrombin which has undergone a solvent-detergent virus inactivation step to remove enveloped viruses. It would also be advantageous to avoid completely the use of other biological and particularly animal-derived products, for example thromboplastin, to activate the prothrombin, as such products may serve as a source of infectious viruses or other undesirable contaminants during the manufacturing process.

In one aspect, the present invention therefore provides a first method for the preparation of virus-inactivated thrombin comprising the steps of:

(a) solvent-detergent virus inactivation of a solution comprising prothrombin and factor X;

(b) loading the product of step (a) onto an anion exchange medium;

(c) washing the medium to remove the reagents used for the solvent-detergent virus inactivation in step (a); and

(d) activating the prothrombin on the medium to form thrombin by the addition of metal ions. Preferably the metal ions are divalent metal ions such as magnesium and/or calcium ions.

Preferably, the thrombin is then selectively eluted from the anion exchange medium.

Alternatively, a solution comprising prothrombin and factor X can be loaded onto an anion exchange medium

B
X

and solvent-detergent virus inactivation carried out on the medium. The present invention therefore also provides an alternative to the above method wherein steps (a) and (b) are replaced by steps (a') and (b'):

5 (a') loading a solution comprising prothrombin and factor X onto an anion exchange medium; and

(b') solvent-detergent virus inactivation of the prothrombin and factor X on the medium. The remaining steps of this alternative method are identical to the remaining steps of the first method described above. The method comprising steps (a) and (b) is preferred over the method comprising steps (a') and (b'), as it is easier to verify attainment of the necessary inactivation conditions prior to loading onto the medium.

The starting material for the process of the invention may be any solution which comprises prothrombin and factor X, including plasma fractions or prothrombin and/or factor X derived by gene expression for example in cell culture or transgenic species, and prothrombin and/or factor X produced by any other synthetic methods. The starting material may be prepared by any suitable method known in the art. Preferably, the starting material is a prothrombin complex or a derivative thereof which contains both prothrombin and factor X. Prothrombin complex may be prepared by methods known in the art, for example by adsorption onto anion exchange media from cryoprecipitate supernatant and subsequent elution (P.A.Feldman, L.Harris, M.E.Haddon, D.R.Evans and J.K.Smith, Thrombosis Research, 1986, Supplement VI:36, incorporated by reference). In a preferred embodiment, the starting material is prothrombin complex concentrate (PCC) which has been prepared under conditions which minimise the level of coagulation factor VII and activated coagulation factors in the prothrombin complex. The so-called "three-factor PCC" is therefore

9
L

a more preferred starting material than "four-factor PCC".

The solvent-detergent virus inactivation step is carried out using reagents and methods known in the art (see for example US 4,481,189, US 4,613,501 and US 4,540,573, all incorporated by reference). Suitable solvents include tri-n-butylphosphate (TNBP). Suitable detergents include polysorbate (Tween) 80, polysorbate (Tween) 20 and Triton X-100. A particularly preferred combination is polysorbate 80 and TNBP. In a preferred embodiment, the prothrombin and factor X-containing solution is stirred with the solvent and detergent reagents. The virus inactivation is carried out at a temperature and for a time sufficient to inactivate any enveloped viruses that may be present. For example, the solvent-detergent treatment may be carried out for from about 1 to about 24 hours, at a temperature of from about 4° to about 37°C, for example at least about 6 hours at a temperature of about 23-27°C.

The solvent-detergent treated prothrombin and factor X containing solution is then loaded onto a suitable anion exchanger under conditions such that the prothrombin and factor X bind to the anion exchange media. If necessary, the solvent-detergent treated solution is first diluted to reduce the ionic strength to one that is suitable for binding of the prothrombin and factor X onto the anion exchanger. Suitable anion exchange media are available commercially, and include DEAE Sepharose CL6B supplied by Amersham Biosciences and Fractogel EMD DEAE 650(S) supplied by Merck. Preferably, the anion exchange medium is present in a column to facilitate washing and elution. Preferably, if an anion exchange medium was used during the preparation of the starting material, for example for the capture of prothrombin and/or factor X from a source material such as plasma, then the same anion exchange medium is used for the process of the invention in order

10
X

to minimise exposure to different reagents.

After loading, the anion exchange medium is washed with one or more suitable washing buffers to remove unbound or loosely bound protein and the solvent-detergent reagents. The washing buffers should be free of reagents which may generate thrombin from the bound prothrombin.

The bound prothrombin is then activated to form thrombin by the addition of suitable metal ions, preferably divalent metal ions such as magnesium or calcium ions, most preferably calcium ions. Combinations of more than one type of metal ion may be used for the activation, for example a mixture of calcium and magnesium ions. Preferably, the metal ions are added in the form of an activation buffer and are present in a concentration of between about 1 and about 40 mM, more preferably between about 1.5 and about 17 mM, and most preferably about 2 mM in the buffer.

The bound prothrombin is incubated with the metal ions for a sufficient time and at a suitable temperature for the activation reaction to proceed. The temperature should be high enough for the reaction to proceed but not so high that the proteins present are denatured or any contaminating microorganisms are encouraged to grow. The reaction is preferably carried out at or below about 26°C, for example at 10°-26°C, more preferably at about room temperature (20°C) or below, for about 19-85 hours, more preferably 19-65 hours and even more preferably for about 40-65 hours. For example, suitable incubation conditions might be for about 65 hours at about 20°C.

Without wishing to be bound by any theory, it is believed that it is the combination of the metal (e.g. calcium) ions and the anion exchange medium to which the prothrombin is bound which allows activation of the prothrombin to form thrombin without the need for addition of any further activating agents, for example thromboplastin. The metal ions activate factor X in the

adsorbed fraction to form factor Xa, and the factor Xa in turn activates the prothrombin to form thrombin. It is also possible to load solvent-detergent virus inactivated factor X onto the anion exchange medium and to activate it to form factor Xa by addition of metal ions before the prothrombin is added to the anion exchange medium. The factor Xa then converts the prothrombin to thrombin on the medium.

The present invention therefore also provides a second method for the preparation of virus-inactivated thrombin comprising the steps of:

- (a) solvent-detergent virus inactivation of a solution comprising factor X;
- (b) loading the product of step (a) onto an anion exchange medium;
- (c) washing the medium to remove the reagents used for the solvent-detergent virus inactivation in step (a);
- (d) activating the factor X on the medium to form factor Xa by the addition of metal ions; and
- (e) loading virus-inactivated prothrombin onto the anion exchange medium such that thrombin is generated.

Preferably, the thrombin is then selectively eluted from the anion exchange medium. Also preferably the metal ions are divalent metal ions such as magnesium and/or calcium ions.

The starting material for the second process of the invention may be any solutions which separately comprise prothrombin and factor X, including plasma fractions, prothrombin and/or factor X derived by gene expression, for example in cell culture or transgenic species, and prothrombin and/or factor X produced by any other synthetic methods. The starting materials may be prepared by any suitable method known in the art. Suitable virus-inactivation, loading and activation conditions for the second method of the invention are as described above for the first method of the invention.

12
L

After the activation of factor X to form factor Xa, the anion exchange medium may optionally be washed using a suitable buffer to remove the metal ions before the prothrombin is added.

- 5 Following the conversion of prothrombin to thrombin, the thrombin may be recovered by elution with a suitable recovery buffer. The ionic strength and pH of the recovery buffer are preferably chosen to selectively remove the thrombin and to leave other
- 10 proteins, for example any unconverted prothrombin, bound to the anion exchange medium. The pH of the recovery buffer used should be below the pI of thrombin such that the thrombin does not bind to the anion exchanger. A suitable pH for the recovery buffer is pH 8.
- 15 Preferably, the buffers used for washing, activation and recovery do not contain any phosphate salts, in order to avoid precipitation of insoluble calcium phosphate during the manufacturing process.

- 20 The thrombin produced is highly purified and concentrated and may be formulated directly without further purification. Alternatively, further purification steps may be carried out if desired. For example, the thrombin solution obtained from the anion exchanger media may be subjected to further virus
- 25 reduction or inactivation steps. For example, the solution may be filtered through a virus removal filter such as a Planova 15N filter. Such filtration may also serve to remove the causative agent of Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE).

- 30 Once separated from the anion exchange medium, the thrombin product may be formulated for long term storage before clinical use. Preferably, the thrombin solution is freeze-dried, optionally in the presence of one or more stabilisers to help limit denaturation during
- 35 freeze drying and any subsequent heat treatment. Suitable stabilizers include carbohydrates such as sucrose, raffinose or trehalose and divalent metal ions

13
X

such as calcium ions. Particularly preferred are a combination of calcium ions and a carbohydrate such as sucrose. Preferably, the use of protein stabilisers such as albumin is avoided so as to minimise possible sources of contamination in the final product.

Suitable freeze drying conditions include primary drying at a temperature of about -35°C and a pressure of about 100-130 microbar (10-13 Pa), followed by secondary drying at a temperature of about +35°C and a pressure of about 30 microbar (3 Pa).

The freeze-dried thrombin product may be subjected to a further virus inactivation step by heat-treatment, for example heating to about 80°C for about 72 hours or 100°C for 24 hours. A combination of calcium ions and a carbohydrate such as sucrose has been found to efficiently stabilise thrombin produced according to the invention during terminal heat treatment to inactivate viruses.

It is desirable for blood-derived products to undergo at least two separate virus inactivation or reduction steps during manufacture. An advantage of the process of the invention is that it allows multiple different virus inactivation or reduction steps to be carried out, in order to inactivate or reduce both enveloped and non-enveloped viruses, and other pathogens, for example the causative agents of TSE. Solvent-detergent treatment is known to disrupt the lipid envelope of enveloped viruses, whilst filtration separates out particles over a certain size and heat treatment inactivates thermally unstable viruses. It is desirable to incorporate multiple inactivation or reduction steps which are based on different principles, in order to remove or reduce as many different pathogens as possible. In a preferred embodiment, the process comprises a further virus inactivation or reduction step in addition to the solvent-detergent treatment. In a more preferred embodiment, the process comprises two

14
f
further virus reduction or inactivation steps in addition to the solvent-detergent treatment.

Preferably, the process comprises a physical virus removal step (e.g. nanofiltration) and a dry heat virus inactivation step in addition to the solvent-detergent treatment.

Another advantage of the process of the invention is that activation of the prothrombin and purification of the resulting thrombin may be achieved using the same type of anion exchange medium as was used previously to prepare the prothrombin and factor X starting material. Formulation of the product also utilizes reagents which have already been used in the preparative process. This minimizes the exposure of the thrombin to a multiplicity of reagents, which is beneficial in the manufacture of a pharmaceutical product. A further advantage of the process is that it minimises the threat to the integrity of other manufacturing operations posed by possible contact with the highly potent thrombin protease. This can be avoided normally only by segregation of the thrombin manufacturing plant from other equipment and activities in the factory. Such segregation is expensive and labour intensive. Also, processing of virus-inactivated (e.g. solvent-detergent treated) intermediates has to be done in a separate, isolated manufacturing area to avoid any subsequent contamination. The prior art inability to generate thrombin after solvent-detergent treatment required the use of significantly more segregated manufacturing space and additional risks in handling the product during transfer from step to step. Additionally, there was also the potential risk to manufacturing staff from handling a protease which can have significant thrombotic effects if inadvertently introduced into their circulation. These problems are minimised by use of the process of the invention because

(a) prior solvent-detergent treatment means that the

4-15

generated thrombin does not need to be processed in numerous different manufacturing areas, each of which would have to be isolated from other activities;

5 (b) the number of manufacturing steps (particularly after generation of thrombin from prothrombin) is minimised; and

(c) the yield is sufficient to provide significant quantities of thrombin from very small volumes.

Thus containment of the process is greatly simplified.

10 It is also advantageous to limit exposure of the product to multiple different reagents during manufacture, as such reagents may serve as a source of undesirable contamination or modification of the product. Minimising the number of reagents and steps
15 required for the manufacture of thrombin from prothrombin is a further advantage of the process of the invention.

The thrombin prepared using the process of the invention may be used clinically, either alone or in
20 combination with fibrinogen in a fibrin sealant kit. The present invention therefore also provides thrombin obtained according to a process of the invention, for use in therapy, and pharmaceutical kits comprising thrombin obtained according a process of the invention
25 in combination with fibrinogen. Preferred are kits comprising thrombin prepared according to a process of the invention and fibrinogen prepared according to the applicant's co-pending PCT application No. (unknown) entitled "Processes for the preparation of fibrinogen"
30 filed on 7 July 2003 claiming priority from UK patent application No. 0216001.8 filed on 10 July 2002, the disclosure of which is hereby incorporated by reference.

The following is a more detailed description of
35 preferred embodiments of the process of the invention.

Removal of cryoprecipitate from plasma

16
A

Frozen human plasma is conditioned at around -11°C , thawed to about $+1^{\circ}\text{C}$ and cryoprecipitate collected by centrifugation. The supernatant is called
5 cryoprecipitate supernatant (CPS).

Capture of prothrombin complex from cryoprecipitate supernatant

Adsorption of prothrombin complex from cryoprecipitate supernatant
10

Anion exchange medium, such as DEAE Sepharose CL-6B, is added to CPS in proportions of, for example, ~10 ml packed anion exchange medium per kilogram CPS. The
15 mixture is stirred for a suitable time and then the medium (including adsorbed protein) is recovered from the CPS, for example by centrifugation.

Elution of the prothrombin complex
20

The recovered anion exchange medium is suspended in a suitable buffer and packed into a chromatography column. The medium is washed with a low salt buffer to remove loosely bound and unwanted proteins. The loading and
25 washing conditions are controlled to specifically minimise the level of coagulation factor VII and activated coagulation factors in the eluted prothrombin complex. The medium is then washed with a high salt elution buffer to recover the prothrombin complex. The
30 protein peak is selectively collected to avoid contamination of the prothrombin complex with activated coagulation factors. The eluate can be stored frozen.

Solvent detergent treatment
35

The prothrombin complex solution is filtered through a $0.45\mu\text{m}$ or smaller pore size filter. Solvent-detergent

17
L

reagents are then added and the mixture is stirred at a temperature and for a length of time known to inactivate any enveloped viruses that may be present.

5 Prothrombin activation chromatography

Dilution of the solvent detergent treated prothrombin complex

10 The solvent detergent treated prothrombin complex is then diluted with, for example, water to reduce the ionic strength of the solution to one that is suitable for binding onto an anion exchanger.

Loading the second anion exchanger

15

The diluted protein solution is pumped through a column containing a packed anion exchange medium. Advantageously, this can be the same medium as used for the preparation of the prothrombin and factor X from CPS or other source. Microbiological contamination during thrombin generation is minimised by suitable sanitization of the anion-exchange medium and by filtration of buffers to remove bacterial contamination (e.g. by use of 0.2µm filters). The medium is washed with the buffer used to equilibrate the column, to remove loosely bound protein and the solvent detergent reagents, and to equilibrate the medium with buffer salts which are most favourable for subsequent processing steps. The medium is then washed with approximately 1 column volume of a buffer containing calcium, for example the equilibration buffer plus 2 mM calcium chloride.

20 Activation incubation

35

The column outlets are clamped off and the column held at a predetermined temperature for a defined time

period, for example, 65 hours at 20°C. During the incubation prothrombin is converted to thrombin.

Recovery of the thrombin

5

At the end of the incubation, the column is washed with the equilibration buffer to recover the thrombin.

Proteins unaffected by the activation incubation remain bound to the medium as the conditions used for this wash, in terms of pH, buffer components and ionic strength, are the same as those used for the wash after loading the column. Thrombin does not bind to anion exchangers at pHs below its pI so is washed off by the buffer. For example, at pH8 thrombin does not bind to anion exchangers but its precursor, prothrombin does bind.

The peak that is eluted is collected in fractions, the first column volumes of column effluent are of lower purity thrombin and contain most of any degraded or damaged thrombin which may be present. The following column volumes are of higher purity and if separated from the first column volumes can be used without further purification. Alternatively, all the column effluent can be collected and purified further.

25

Virus filtration

A further virus reduction step can be used. The thrombin-containing column eluate can be filtered through a validated virus removal filter such as a Planova 15N filter. Such filtration may also remove or reduce other pathogens, for example the causative agents of TSE.

Formulation

The thrombin is now formulated and adjusted to its

19
28

target potency for long term storage before clinical use. A recommended method is the addition of a carbohydrate, such as sucrose, and calcium, at a target sodium chloride concentration and then freeze-drying the solution. Before freeze-drying the formulated product may be filtered through a sterilizing filter (e.g. 0.2µm filter) as required for pharmaceutical use.

Terminal heat treatment

10

The freeze-dried formulation can be terminally heat-treated to inactivate any viruses that may be present.

The thrombin prepared using the process of the invention may be used clinically, either alone or in combination with fibrinogen in a fibrin sealant kit. The present invention therefore also provides thrombin obtained according to the process of the invention, for use in therapy, and pharmaceutical kits comprising thrombin obtained according the process of the invention in combination with fibrinogen. Preferred are kits comprising thrombin prepared according to the process of the invention and fibrinogen prepared according to the applicant's co-pending United Kingdom patent application entitled "Process and Composition" filed on 10 July 2002.

The invention will be further illustrated by the following non-limiting examples.

The preparation of PCC is described in: Feldman P A, Bradbury P I, Williams J D, Sims G E C, McPhee J W, Pinnell M A, Harris L, Crombie G I, Evans D R, "Large scale preparation and biochemical characterisation of a new high purity factor IX concentrate prepared by metal chelate affinity chromatography.", Blood Coagulation and Fibrinolysis 1994;5:939-948.

The pH of solutions was adjusted using suitable concentrations of sodium hydroxide to increase the pH or

20
12

hydrochloric acid to reduce the pH.

Thrombin was measured by clotting assay which measures time to clot a sample of fibrinogen and/or by chromogenic assay which measured absorbance of a chromophore released by thrombin-mediated cleavage of a synthetic peptide. Such assay methods are known to those skilled in the art.

Thrombin clotting assay

10

The standard is calibrated versus an internationally accepted standard, and is diluted in assay buffer, such as 50 mM trometamol, 100 mM sodium chloride, 1% albumin, pH 7.5, to a suitable range of concentrations, for example, 1 to 7 iu/ml. The samples are diluted to within this range of concentrations.

The clotting times of the diluted thrombin solutions are measured after the addition of human fibrinogen at a fixed concentration. The relationship between test samples and the standard then allows calculation of the thrombin concentration in the sample, expressed in international units (iu) per ml.

Thrombin chromogenic assay

25

The standard is calibrated versus an internationally accepted standard, and is diluted in assay buffer, such as 50 mM trometamol, 100 mM sodium chloride, 0.1% albumin, pH 7.3, to a suitable range of concentrations, for example, 0.5 to 5 iu/ml. The samples are diluted to within this range of concentrations.

The diluted thrombin is then added to a chromogenic substrate (for example S-2238 from Chromogenix) and the mixture is incubated for a defined period of time. The reaction is then stopped by addition of, for example,

35

221

ac tic acid. The absorbance of the solution is then measured at 405 nm (for S-2238). The concentration of thrombin is proportional to the colour developed and the sample concentration can be interpolated from the standard line.

Example 1: Prothrombin activation chromatography
Trometamol buffers and incubation at 20°C for 62.5 hours

1.19 kg Of solvent-detergent treated prothrombin complex was diluted with 2.50 kg of water to reduce its conductivity from 26.4 mS/cm to 9.28 mS/cm. The solution was then titrated to pH8.0. This solution was loaded onto a 5 cm diameter jacketed column packed with a 13 cm high bed of DEAE Sepharose CL6B, equilibrated with 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, pH8.0. After loading the medium was washed with 15 column volumes of 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, pH8.0 to remove the solvent detergent reagents and weakly bound protein. The medium was then washed with 1 column volume of 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, 2 mM calcium chloride, pH8.0. The column outlets were closed. Water at 20°C was circulated through the jacket.

After 62.5 hours, circulation of water was stopped. The medium was washed with 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, pH8.0 to recover the thrombin generated during the incubation. The first 3 column volumes of column effluent which contained 3.8 million international units (iu) of thrombin clotting activity were discarded as the specific clotting activity was less than 2000 iu/mg total protein. The next 11 column volumes of effluent which contained 2.8 million iu clotting activity had a specific activity of 2400 iu/mg and were pooled for further processing, without the need for additional protein purification steps.

22
2

Example 2: Prothrombin activation chromatography
Citrate-phosphate buffers and DEAE Sepharose

4.4 kg of solvent-detergent treated prothrombin complex
5 was diluted with 6.3 kg of water to reduce its
conductivity to 9.3 mS/cm. The solution was then
titrated to pH8.0. 7.1 kg of this solution was loaded
onto a 9 cm diameter column packed with a 12.5 cm high
bed of DEAE Sepharose CL6B, equilibrated with 8 mM
10 citrate, 10 mM phosphate, 68.5 mM sodium chloride,
pH8.0. After loading the medium was washed with 11
column volumes of 8 mM citrate, 10 mM phosphate, 68 mM
sodium chloride, pH8.0 to remove the solvent detergent
reagents and weakly bound protein. The medium was then
15 washed with 1 column volume of 8 mM citrate, 10 mM
phosphate, 64 mM sodium chloride, 2 mM calcium chloride,
pH8.0. The column outlets were closed. The column was
stored at room temperature.

After about 64 hours, the medium was washed with 8
20 mM citrate, 10 mM phosphate, 68 mM sodium chloride,
pH8.0 to recover the thrombin generated during the
incubation. A total of 11 million iu of clotting
activity were recovered from the column of which 3.8
million iu had a specific activity of > 2000 iu/mg and
25 were pooled for further processing, without the need for
additional protein purification steps.

Example 3: Prothrombin activation chromatography
Citrate-phosphate buffers and Fractogel EMD DEAE 650(S)

30 148 ml of solvent-detergent treated prothrombin complex
was diluted with 121 ml of 8 mM citrate, 10 mM
phosphate, pH 9.0 to reduce its conductivity to 16
mS/cm. The solution was then titrated to pH8.0. 111 g
35 of this solution was loaded onto a 1 cm diameter column
packed with 10 ml of Fractogel EMD DEAE 650(S),
equilibrated with 8 mM citrate, 10 mM phosphate, 137 mM

2423

sodium chloride, pH8.0. After loading, the medium was washed with 12 column volumes of 8 mM citrate, 10 mM phosphate, 137 mM sodium chloride, pH8.0 to remove the solvent detergent reagents and weakly bound protein. The medium was then washed with 1 column volume of with 8 mM citrate, 10 mM phosphate, 129 mM sodium chloride, 2 mM calcium chloride, pH8.0. The column outlets were closed. The column was stored at room temperature.

After about 64 hours, the medium was washed with 8 mM citrate, 10 mM phosphate, 129 mM sodium chloride, 2 mM calcium chloride, pH8.0 to recover the thrombin generated during the incubation. A total of 0.4 million iu of clotting activity were recovered from the column of which 0.3 million iu had a specific activity of > 2000 iu/mg and were pooled for further processing, without the need for additional protein purification steps.

Example 4

Trometamol buffers and incubation at 10, 14.5 and 22°C for about 64 hours

195 g of solvent-detergent treated prothrombin complex was diluted with 424 g of water to reduce its conductivity from 28.9 mS/cm to 9.39 mS/cm. The solution was then titrated to pH8.0 with 1 M sodium hydroxide. About 140 g of this solution was loaded onto three 1 cm diameter jacketed columns packed with a 13 cm high bed of DEAE Sepharose CL6B, equilibrated with 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, pH8.0. After loading the medium was washed with 10 column volumes of 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, pH8.0 to remove the solvent detergent reagents and weakly bound protein. The medium was then washed with 1 column volume of 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, 2 mM calcium chloride, pH8.0. The column outlets were closed. One column was left at room temperature (21.8°C

424

± 0.4°). The others were maintained at 10° or 14.5°C by circulating cooled water through the column jackets.

After about 64 hours, the temperature in the jackets was changed to 18°C and the jacket cooling was stopped. The medium was washed with 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, pH8.0 to recover the thrombin generated during the incubation. The results are shown in Table 1.

Table 1

Column	Incubation temperature, °C	Thrombin clotting activity	
		Total recovered, iu	Total >2000 iu/mg, iu
1	10	212,000	149,000
2	14.5	293,000	174,000
3	22	353,000	142,000

Example 5

Trometamol buffers and incubation at 15, 23 and 26°C for about 64 hours

458 g of solvent-detergent treated prothrombin complex was diluted with 977g of water to reduce its conductivity from 28.9 mS/cm to 9.39 mS/cm. The solution was then titrated to pH8.0 with 1 M sodium hydroxide. About 140 g of this solution was loaded onto three 1.6 cm diameter jacketed columns packed with a 13 cm high bed of DEAE Sepharose CL6B, equilibrated with 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, pH8.0. After loading the medium was washed with 10 column volumes of 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, pH8.0 to remove the solvent detergent reagents and weakly bound protein. The medium was then washed with 1 column volume of 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, 2 mM calcium chloride, pH8.0. The column outlets were

25
2

closed. Water was then circulated through the column jackets at 15°, 23° and 26°C.

5 After 65 hours, circulation of water was stopped. The medium was washed with 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, pH8.0 to recover the thrombin generated during the incubation. The results are shown in Table 2.

10 Table 2

Column	Incubation temperature, °C	Thrombin clotting activity	
		Total recovered, iu	Total >2000 iu/mg, iu
1	15	864,000	423,000
2	23	756,000	284,000
3	26	800,000	128,000

15

Example 6
Trometamol buffers and incubation at room temperature for 16, 40 and 64 hours

20

248 g of solvent-detergent treated prothrombin complex was diluted with 523g of water to reduce its conductivity from 26.9 mS/cm to 9.33 mS/cm. The solution was then titrated to pH8.0. About 195 g of this solution was loaded onto each of three 1 cm diameter column packed with a 13 cm high bed of DEAE Sepharose CL6B, equilibrated with 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, pH8.0. After loading each column, the medium was washed with 10 column volumes of 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, pH8.0 to remove the solvent detergent reagents and weakly bound protein. The medium was then washed with 1 column volume of 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, 5 mM calcium chloride, pH8.0. The column outlets were closed. The

25

30

26
27

columns were stored at room temperature.

The three columns were stored for 16 hours, 40 hours, and 64 hours. At the end of each incubation the medium was washed with 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, pH8.0 to recover the thrombin generated during the incubation. The results are shown in Table 3.

Table 3

Column	Incubation, hours	Thrombin clotting activity	
		Total recovered, iu	Total >2000 iu/mg, iu
1	16	30,700	0
2	40	407,000	197,000
3	64	500,000	158,000

Example 7: Mechanism of thrombin generation

Experiments were performed to determine the mechanism of prothrombin activation to thrombin in the process of the invention.

Materials

Purified virus-inactivated prothrombin
Purified virus-inactivated factor X
Virus-inactivated antithrombin

The prothrombin and factor X had been inactivated by solvent and detergent treatment using tri-n-butyl phosphate and polysorbate 80. The antithrombin had been virus-inactivated by heat-treatment.

Method

27

Three chromatography columns were packed with DEAE
Sephacrose CL-6B anion-exchange gel and equilibrated in
trometamol-NaCl buffer. The three columns were then
used as described in Table 4, and the products then
5 tested for thrombin activity.

Table 4

	Column 1	Column 2	Column 3
10	Load prothrombin	Load Factor X	Load Factor X
	Equilibration	Equilibration	Equilibration
	Buffer Wash	Buffer Wash	Buffer Wash
15	Calcium buffer incubation	Calcium buffer incubation	Calcium buffer incubation
	Equilibration	Equilibration	Equilibration
	Buffer Elution	Buffer Wash	Buffer Wash
20		Load prothrombin	Load Antithrombin
		Equilibration	Equilibration
		Buffer Elution	Buffer Wash
25			Load prothrombin
			Equilibration
			Buffer Elution

30 The results are shown in Table 5.
Table 5

	Column 1	Column 2	Column 3
35	Total Prothrombin loaded, iu	2039	2044
	Total Factor X loaded applied, u	0	1222
			1196

2428

5	Antithrombin applied, u	0	0	850
	Thrombin generated, iu per iu prothrombin	<0.07	113	<0.07

The results show that thrombin cannot be generated from virus-inactivated prothrombin exclusively by calcium (Column 1). Thrombin can be generated from virus-inactivated prothrombin by incubation with virus-inactivated factor X which has previously been incubated with calcium and the calcium is then removed before prothrombin contact (Column 2). Thrombin cannot be generated from virus-inactivated prothrombin by incubation with virus-inactivated factor X which has previously been incubated with calcium, if the factor X/factor Xa is then inactivated with antithrombin and both calcium and antithrombin are removed before prothrombin contact (Column 3).

The mechanism of thrombin generation in the process of the invention requires factor X to be activated by calcium and the prothrombin to then be activated to thrombin by the action of activated factor X (i.e. factor Xa), rather than directly by the calcium. Isolated prothrombin is not therefore a suitable starting material for use in the process of the invention.

Example 8: Lack of thrombin generation using only purified prothrombin and calcium

Prothrombin (Factor II) was separated from other prothrombin complex clotting factor proteins after virucidal treatment with solvent and detergent, by passage through a copper-charged Chelating Sepharose

29
2

column.

5 This protein solution was either used in the presence of the co-purifying solvent and detergent reagents (SD), or was separated from the solvent and detergent reagents by re-chromatography on DEAE Sepharose anion-exchange gel.

10 The prothrombin in solution was incubated at pH 6.5 with 40mM calcium chloride buffer at 25°C for 3 hours. Thrombin activity was then measured.

The results are shown in Table 6.

Table 6

15	Samples	Thrombin activity after 3 hours, iu/ml
	Prothrombin with SD	less than 0.05
	Prothrombin after removal of SD	less than 0.05

20 The results confirm that isolated human prothrombin was not converted into thrombin by the action of calcium ions alone after undergoing a solvent-detergent virus inactivation procedure, regardless of whether the SD reagents were removed or not before addition of the calcium ions. Isolated prothrombin is not therefore a suitable starting material to use in the process of the invention.

30 Example 9: Lack of thrombin generation by calcium action on prothrombin complex during or after treatment with solvent-detergent reagents

35 Samples of three different prothrombin complex concentrates (containing factors II, IX and X) were incubated with 20mM calcium chloride in solution and

assayed for thrombin activity after incubation for 3 hours and 5 hours.

The prothrombin complex (PCC) samples derived from human plasma were:

- A: PCC eluate from anion-exchange chromatography of CPS.
- B: PCC eluate containing 1% polysorbate 80 detergent and 0.3% tri-n-butyl phosphate (TNBP) solvent.
- 10 C: solvent-detergent-treated PCC from which the solvent-detergent had been removed.

None of the prothrombin complex materials used in these experiments were activated during their manufacture, either intentionally or unintentionally, as determined by the NAPTT and FCT tests for activated clotting factors.

The results are shown in Table 7.

Table 7

Sample	Thrombin after 3 hours, iu/ml	Thrombin after 5 hours, iu/ml
A	619	1168
B	less than 1	3.48
25 C	less than 1	2.02

The results show that negligible thrombin was generated from (non-activated) prothrombin complex in solution after it had been treated with solvent-detergent regardless of whether the solvent-detergent remained in the preparation at the time of incubation with calcium (compare the results for sample A with those for samples B and C). This confirmed the prior art teaching that calcium alone was not sufficient to activate solvent-detergent treated prothrombin complex. It is an

31

essential feature of the process of the invention that the solvent-detergent treated prothrombin containing material is loaded onto an anion exchange medium in order for thrombin to be generated.

5

Example 10Activation with calcium or magnesium ions

249 ml of solvent-detergent treated prothrombin complex
10 was diluted with 150 ml deionised water to reduce its conductivity to 16 mS/cm. The solution was then titrated to pH8.0 with 1 M sodium hydroxide. 82 to 87 g of this solution was loaded onto each of three 1 cm diameter columns, each packed with 10 ml of DEAE
15 Sepharose CL6B, equilibrated with 8 mM citrate, 10 mM phosphate, 137 mM sodium chloride, pH8.0. After loading, the medium was washed with 10 column volumes of 8 mM citrate, 10 mM phosphate, 137 mM sodium chloride, pH8.0 to remove the solvent detergent reagents and
20 weakly bound protein. The medium was then washed with 1 column volume of activation buffer, either 8 mM citrate, 10 mM phosphate, 129 mM sodium chloride, 2 mM calcium chloride, pH8.0 (column 1) or 8 mM citrate, 10 mM phosphate, 129 mM sodium chloride, 2 mM magnesium
25 chloride, pH8.0 (column 2) or 8 mM citrate, 10 mM phosphate, 129 mM sodium chloride, 2 mM calcium chloride, 2 mM magnesium chloride, pH8.0 (column 3). The column outlets were closed. The columns were stored at room temperature.

30

After about 64 hours, the medium was washed the activation buffer to recover the thrombin generated during the incubation. The results are shown in Table 8.

35

Table 8

M32

Column	Total thrombin chromog nic activity recovered	Metal Ion in Activation Buffer
1	178,000 iu	Calcium
2	66,500 iu	Magnesium
3	256,000 iu	Calcium/magnesium

5

Example 11: Formulation

10 Virus filtered thrombin solution prepared as in Example 1 was formulated to 10 mM trometamol, 200 mM NaCl, 40 mM CaCl₂, 2% sucrose, pH7.0 and potency adjusted to about 500 iu thrombin clotting activity/ml. 5 ml of this solution was dispensed into glass vials and freeze-dried. The freeze-dried material was heat-
15 treated at 80°C for 72 hours. In 3 runs an average recovery of 98% of the thrombin clotting activity was achieved across freeze-drying and an average of 98% across heat-treatment.

20 Example 12: Formulation

Thrombin solution was formulated at approximately 1250 iu clotting activity/ml. All formulations contained 10 mM trometamol and 200 mM sodium chloride at pH 7.0.
25 Additionally, they contained the added components shown below. The solutions were filled into vials, 2 ml per vial. The vials were freeze-dried and dry heat treated at 80°C for 72 hours. The vials were then reconstituted with water and assayed to determine thrombin activity.
30 Thrombin activity was compared with thrombin activity in samples taken before freeze-drying. The results are shown in Table 9.

Table 9

33
73

	[Calcium chloride], mM	Additional components	Recovery of clotting activity across freeze-drying and heat-treatment
	2	-	59%
	10	-	69%
5	40	-	88%
	2	1% sucrose	88%
	2	2% sucrose	93%
	2	1% trehalose	98%
	2	1% raffinose	88%
10	2	1% human albumin	60%
	2	1% PEG 4000	78%

15 The results showed that the conventional albumin stabiliser did not provide stability across freeze-drying and heat-treatment. Other combinations of calcium and carbohydrate gave improved stability across freeze-drying and heat-treatment.

20 Example 13: Thrombin formulation, freeze drying and heat-treatment

Thrombin solution was formulated at 500 iu/ml (5ml fill). All formulations also contained 10 mM trometamol and 200 mM sodium at pH 7.0 and additionally contained the components shown below. The solutions were filled into vials, 5 ml per vial. The vials were freeze-dried and dry heat treated at 80°C for 72 hours or 100°C for 24 hours. The vials were then reconstituted with water and assayed to determine thrombin activity. Thrombin activity was compared with thrombin activity in samples taken before freeze-drying. The results are shown in Table 10.

34
M

Table 10

	[Calcium chloride], mM	Additional components	Fill volume, ml	Recovery of clotting activity across freeze-drying and heat-treatment	
				80°C/72 hours	100°C/24 hours
5	2	2% sucrose	5	79%	-
	40	2% sucrose	5	97%	89%
	2	1% trehalose	5	92%	73%

10 The results showed that the optimum formulation was 10 mM trometamol and 200 mM sodium at pH 7.0 plus 40mM calcium chloride and 2% sucrose.

Example 14: Preparation of Thrombin

15 1.17 kg of solvent-detergent treated prothrombin complex was diluted with 2.58 kg of water to reduce its conductivity from 27.5 mS/cm to 9.12 mS/cm. The solution was then titrated to pH8.0 with 0.5 M sodium hydroxide. This solution was loaded onto a 5 cm
20 diameter jacketed column packed with a 13 cm high bed of DEAE Sepharose CL6B, equilibrated with 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, pH8.0. After loading the medium was washed with 15 column volumes of 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, pH8.0 to remove the solvent
25 detergent reagents and weakly bound protein. The medium was then washed with 1 column volume of 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, 2 mM calcium chloride, pH8.0. The column outlets were closed. Water at 20°C was circulated through the column jacket.

30

After 64 hours, circulation of water was stopped. The medium was washed with 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, pH8.0 to recover the thrombin generated during the incubation. The first 4 column volumes f column

effluent contained 4.3 million international units (iu) of thrombin clotting activity with a specific clotting activity of less than 2000 iu/mg total protein. The next 9 column volumes of effluent which contained 2.2 million iu clotting activity at a specific activity of 2100 iu/mg was frozen at -40°C and kept for further processing.

900 g of the frozen eluate was thawed and filtered using a Planova 15N virus filter that had been equilibrated with 10 mM trometamol, 110 mM sodium chloride, pH8.0. There was a measured recovery of 95% of the thrombin clotting activity across freeze/thaw and 102% across virus filtration.

The filtrate was then formulated to 10 mM trometamol, 200 mM sodium chloride, 40 mM calcium chloride, 2% sucrose, by addition of a suitable buffer. The solution was diluted to an estimated thrombin clotting activity concentration of 550 iu/ml with 10 mM trometamol, 200 mM sodium chloride, 40 mM calcium chloride, 2% sucrose, pH7.0, and then titrated with 0.5 M hydrochloric acid to pH7.0.

This solution was then filtered through a 0.2 µm sterilising filter and then filled into vials, 5 g of solution per vial. The vials were freeze-dried and then dry-heat treated at 80°C for 72 hours. There was a measured 97% recovery of the thrombin clotting activity across sterilising filtration, 102% across lyophilisation and 100% across dry-heat treatment.

Example 15: Incubation times

150 ml of solvent-detergent treated prothrombin complex was diluted with water to reduce the conductivity to approximately 9.3 mS/cm. The solution was then titrated

36
27

to pH8.0. This quantity was loaded on to each of four columns packed with 12.5-12.9mL of DEAE Sepharose CL6B, which had been equilibrated with 10mM trometamol, 110mM sodium chloride pH8.0. The columns were then washed with the same buffer to remove solvent-detergent reagents and weakly bound protein. The columns were then washed with 10mM trometamol, 110mM sodium chloride, 2mM calcium chloride pH8.0, the column outlets were closed and the columns were isolated at room temperature (approximately 20°C) for periods between 35 and 85 hours. At the end of each period, one of the columns was washed with 10mM trometamol, 110mM NaCl pH8.0 to recover the thrombin generated. The results are shown in Table 11:

Table 11

Column	Incubation (hours)	Thrombin clotting activity	
		Total recovered (iu)	Total >2000 iu/mg (iu)
1	35	229,344	144,751
2	45	267,860	144,463
3	65	289,359	128,578
4	85	266,844	101,687

There is a general trend of increasing yield (total units) but decreasing purity (units >2000 iu/mg) with increasing incubation time. A skilled person can choose the incubation time to give the most favourable balance between total yield and purity in any particular situation.

37
ZCClaims

1. A method for the preparation of virus-inactivated thrombin comprising the steps of:
- 5 (a) solvent-detergent virus inactivation of a solution comprising prothrombin and factor X;
- (b) loading the product of step (a) onto an anion exchange medium;
- (c) washing the medium to remove the reagents used for
- 10 the solvent-detergent virus inactivation in step (a); and
- (d) activating the prothrombin on the medium to form thrombin by the addition of metal ions.
- 15 2. A method according to claim 1, wherein the solution comprising prothrombin and factor X is a prothrombin complex.
3. A method for the preparation of virus-inactivated thrombin comprising the steps of:
- 20 (a) solvent-detergent virus inactivation of a solution comprising factor X;
- (b) loading the product of step (a) onto an anion exchange medium;
- 25 (c) washing the medium to remove the reagents used for the solvent-detergent virus inactivation in step (a);
- (d) activating the factor X on the medium to form factor Xa by the addition of metal ions; and
- (e) loading virus-inactivated prothrombin onto the
- 30 anion exchange medium such that thrombin is generated.
4. A method according to any one of claims 1 to 3 wherein the metal ions are divalent metal ions.

30
5
2

5. A method according to claim 4 wherein the divalent metal ions are magnesium and/or calcium ions.

6. A method according to any one of claim 1 to 5,
5 further comprising the step of
(e) selectively eluting the thrombin from the anion exchange medium.

7. A method according to claim 6, further comprising
10 the steps of
(f) passing the product of step (e) through a filter which retains pathogens;
(g) adding a divalent metal ion and a carbohydrate to the product of step (f), and
15 (h) freeze drying and heat treating the product of step (g) to inactivate viruses.

8. A method according to any one of claims 1 to 7, wherein steps (a) and (b) are replaced by steps (a') and
20 (b'):
(a') loading a solution comprising prothrombin and factor X onto an anion exchange medium; and
(b') solvent-detergent virus inactivation of the prothrombin and factor X on the medium.

25 9. Thrombin prepared according to the method of any one of claims 1 to 8.

10. Thrombin prepared according to the method of any
30 one of claims 1 to 8, for use in therapy.

11. A pharmaceutical formulation comprising thrombin prepared according to the method of any one of claims 1

39
D

to 8.

12. A pharmaceutical kit comprising thrombin prepared according to the method of any one of claims 1 to 8,
5 together with fibrinogen.

13. A kit as claimed in claim 12 wherein the fibrinogen is prepared by a method comprising the steps of:

- 10 (a) loading a solution comprising fibrinogen onto an immobilised metal ion affinity chromatography matrix under conditions such that the fibrinogen binds to the matrix, and
(b) selectively eluting the fibrinogen from the matrix.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual Oficina Internacional	A1	(10) Número de Solicitud Internacional: WO 2004/007707
(43) Fecha de Publicación Internacional: 22 de enero de 2004 (22.01.2004)		(74) Mandatario: FRANK B. DEHN & CO.; 179 Queen Victoria Street, London EC4V 4EL (GB).
(51) Clasificación internacional de patentes: C12N 9/74, A61K 38/30, G01N 33/86, A61K 38/48		(81) Estados Designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT (modelo de utilidad), AT AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (modelo de utilidad), CZ, DE (modelo de utilidad), DE, DK (modelo de utilidad), DK, DM, DZ, EC, EE (modelo de utilidad), EE, ES, FI (modelo de utilidad), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK (modelo de utilidad), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/GB2003/002942		
(22) Fecha de Publicación Internacional: 7 de julio de 2003 (07.07.2003)		
(25) Idioma de presentación: Inglés		
(26) Idioma de publicación: Inglés		
(30) Fecha de prioridad: 0216002.6 10 de julio de 2002 (10.07.2002) GB		(84) Estados Designados (regional): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto US): NATIONAL BLOOD AUTHORITY [GB/GB]; Oak House, Reeds Crescent, Watford, Hertfordshire WD1 1QH (GB).		Publicada: - Con el reporte de búsqueda internacional
(72) Inventores: a		Para los códigos de dos letras y abreviaciones, consultar las "Guías y Notas sobre los Códigos y Abreviaciones" que aparecen al comienzo de cada publicación regular de la Gaceta del PCT.
(75) Inventores/Solicitantes (sólo para US): CONNOLLY, Caroline [GB/GB]; West Research Office, Administration Building, Western Infirmary, Glasgow G11 6NT (GB). HARDWAY, Christopher [GB/GB]; Bio Products Laboratory, Dagger Lane, Elstree, Hertfordshire WD6 3BX (GB). EVANS, David [GB/GB]; Bio Products Laboratory, Dagger Lane, Elstree, Hertfordshire WD6 3BX (GB). FELDMAN, Peter [GB/GB]; Bio Products Laboratory, Dagger Lane, Elstree, Hertfordshire WD6 3BX (GB).		

(54) Título: PROCESO PARA PRODUCIR UNA PREPARACIÓN DE TROMBINA CON VIRUS INACTIVADOS

(57) Resumen: La presente invención describe un método para la preparación de trombina con virus inactivados que comprende inactivación de virus con solvente y detergente de una solución que comprende protrombina y factor X, cargar la protrombina y el factor X de virus inactivados sobre un medio de intercambio aniónico, lavar el medio para remover los reactivos usados para la inactivación de virus con solvente y detergente y activar la protrombina sobre el medio para formar trombina mediante la adición de iones metálicos, de preferencia iones de calcio. La trombina después se eluye, de preferencia selectivamente desde el medio de intercambio aniónico.

**PROCESO PARA PRODUCIR UNA PREPARACION DE TROMBINA CON VIRUS
INACTIVADOS**

DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a procesos para la preparación de trombina con virus inactivados y a los productos preparados mediante estos procesos.

La trombina es una proteasa de plasma multifuncional generada en la corriente sanguínea por medio de la activación de su precursor inactivo, la protrombina (también conocida como factor II). La protrombina se activa esta misma mediante la acción del factor X activado (factor Xa). Una de las funciones principales de la trombina en el plasma de la sangre es convertir el fibrinógeno soluble en fibrina insoluble en la etapa final de la cascada de coagulación de la sangre. Los monómeros de fibrina producidos mediante la acción de la trombina se agrupan entre sí y después se reticulan para formar un coágulo de sangre. La trombina se usa en terapia sola y en combinación con el fibrinógeno en los cicatrizantes llamados de fibrina, para lograr la hemostasis, para cicatrizar heridas y para la adhesión controlada de tejido.

Para todas las aplicaciones clínicas, es importante tener trombina altamente pura para minimizar cualesquiera efectos colaterales indeseables que resultan de, por ejemplo,

42
X

la presencia de otras proteasas o factores de coagulación, u otros componentes contaminantes. Además, es altamente deseable que la trombina para el uso clínico, en particular si se deriva de fuentes humanas o animales, se trate para inactivar cualquier virus en la sangre que pudiera estar presente, por ejemplo virus de hepatitis o HIV. Son conocidos en la técnica diferentes métodos de inactivación, que incluyen, pasteurización, tratamiento térmico seco y tratamiento con solvente-detergente (Pathogen Inactivation of Labile Blood Products, Council of Europe Expert Committee and Blood Transfusion Study Group on Pathogen Inactivation in Labile Blood Products, *Transfusion Medicine*, 2001, 11, 149-175). También es deseable que se eliminen o reduzcan otros patógenos, por ejemplo los agentes causales de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (TSE, por sus siglas en inglés), que se cree actualmente que son priones.

El tratamiento térmico seco se conoce que es efectivo para la inactivación de virus cubiertos y algunos descubiertos, mientras que el tratamiento con solvente-detergente se conoce que es efectivo para la inactivación de virus cubiertos (es decir, recubiertos con lípidos) tal como hepatitis B. El tratamiento con solvente-detergente es un método usado ahora comúnmente para la inactivación de virus de los productos de la sangre destinados para el uso clínico.

En el pasado, la activación de protrombina a trombina a

43 ~~1~~

menudo se llevó a cabo por medio de la adición de iones de calcio y tromboplastina (factor III). La tromboplastina sería derivada de las fuentes humana y animal y por lo tanto, fue una fuente de contaminación posible del producto final.

US 5,304,372 describe un proceso para la preparación de un concentrado de trombina humana de la fracción de PPSB de plasma. El proceso comprende la activación de la protrombina en la fracción PPSB para producir trombina mediante la adición de cloruro de calcio, seguido del tratamiento con solvente-detergente en el producto resultante para inactivar los virus. De acuerdo con US 5,304,372 el tratamiento con solvente-detergente no puede llevarse a cabo en el material iniciador de PPSB porque eliminaría otros factores, tales como los fosfolípidos necesarios para la reacción de activación de la protrombina a la trombina.

EP-A-0,378,798 describe un proceso para la preparación de trombina que comprende absorber el factor II del plasma o las fracciones de plasma sobre un soporte sólido, activar el factor II sobre el soporte sólido a la trombina y después eluir la trombina.

US 5,714,370 describe la preparación de trombina a partir de protrombina con virus inactivados usando sales que pueden coagular de forma activa para efectuar la activación de la protrombina a trombina. El único método descrito para la inactivación de virus de la protrombina es el tratamiento

44

térmico.

El Reporte Anual de 1993 del Dr. Karl Landsteiner Foundation on research at CLB (el Laboratorio Central del servicio de transfusión sanguínea del Netherlands Red Cross) también reportó en la página 10, que la activación de la protrombina tratada con solvente-detergente para formar trombina con iones de calcio, fue únicamente exitosa en presencia de fosfolípidos adicionados.

Sería ventajoso proporcionar un método para la preparación de trombina a partir de protrombina que ha experimentado una etapa de inactivación de virus con solvente-detergente para remover los virus cubiertos. También sería ventajoso evitar completamente el uso de otros productos biológicos y particularmente derivados de animales, por ejemplo tromboplastina, para activar la protrombina, ya que tales productos pueden servir como una fuente de virus infecciosos u otros contaminantes indeseables durante el proceso de manufacturación.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un primer método para la preparación de trombina con virus inactivados que comprende las etapas de:

(a) inactivación del virus con solvente-detergente de una solución que comprende protrombina y factor X;

(b) cargar el producto de la etapa (a) sobre un medio de intercambio aniónico;

45
X

(c) lavar el medio para remover los reactivos usados para la inactivación del virus con solvente-detergente en la etapa (a); y

(d) activar la protrombina sobre el medio para formar trombina mediante la adición de iones metálicos. De preferencia los iones metálicos son iones metálicos divalentes, tales como iones de magnesio y/o calcio.

De preferencia, la trombina después se eluye selectivamente desde el medio de intercambio aniónico.

De manera alternativa, una solución que comprende protrombina y el factor X puede cargarse sobre un medio de intercambio aniónico y la inactivación de los virus con solvente-detergente llevado a cabo en el medio. Por lo tanto, la presente invención también proporciona una alternativa para el método anterior, en donde las etapas (a) y (b) se reemplazan por las etapas (a') y (b'):

(a') cargar una solución que comprende protrombina y el factor X sobre un medio de intercambio aniónico; y

(b') inactivación del virus con solvente-detergente de la protrombina y el factor X sobre el medio. Las etapas restantes de este método alternativo son idénticas a las etapas restantes del primer método descrito anteriormente. El método que comprende las etapas (a) y (b) se prefiere sobre el método que comprende las etapas (a') y (b'), ya que es más fácil de verificar la realización de las condiciones de

46

inactivación necesarias antes de cargar sobre el medio.

El material iniciador para el proceso de la invención puede ser cualquier solución que comprenda protrombina y factor X, incluyendo las fracciones de plasma o la protrombina y/o factor X derivado de la expresión génica, por ejemplo en el cultivo celular o especies transgénicas y la protrombina y/o factor X producido por cualesquiera otros métodos sintéticos. El material iniciador puede prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica. De preferencia, el material iniciador es un complejo de protrombina o un derivado del mismo, que contiene la protrombina y el factor X. El complejo de protrombina puede prepararse mediante los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante adsorción sobre un medio de intercambio aniónico del sobrenadante crioprecipitado y la elución subsecuente (P.A. Feldman, L. Harris, M.E. Haddon, D.R. Evans and J.K. Smith, Thrombosis Research, 1986, Suplemento VI:36, incorporado por referencia). En una modalidad preferida, el material iniciador es el concentrado del complejo de protrombina (PCC, por sus siglas en inglés) que se ha preparado bajo las condiciones que minimizan el nivel de coagulación del factor VII y los factores de coagulación activados en el complejo de protrombina. Por lo tanto, el llamado "PCC del factor tres" es un material iniciador más preferido que el "PCC del factor cuatro".

47 7

La etapa de inactivación del virus con solvente-detergente se lleva a cabo usando los reactivos y métodos conocidos en la técnica (ver por ejemplo, US 4,481,189, US 4,613,501 y US 4,540,573) todos incorporados por referencia). Los solventes apropiados incluyen tri-n-butilfosfato (TNBP). Los detergentes apropiados incluyen polisorbato (Tween), 80, polisorbato (Tween) 20 y Triton-X-100. Una combinación particularmente preferida es polisorbato 80 y TNBP. En una modalidad preferida, la protrombina y la solución que contiene el factor X se agita con los reactivos de solvente y detergente. La inactivación del virus se lleva a cabo a una temperatura y durante un tiempo suficiente para inactivar cualesquiera virus cubiertos que pudieran estar presentes. Por ejemplo, el tratamiento con solvente-detergente puede llevarse a cabo durante aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas, a una temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 37°C, por ejemplo por lo menos aproximadamente 6 horas a una temperatura de aproximadamente 23-27°C.

La protrombina tratada con solvente-detergente y la solución que contiene el factor X después se carga sobre un intercambiador aniónico apropiado, bajo condiciones de modo que la protrombina el factor X se enlacen al medio de intercambio aniónico. Si es necesario, la solución tratada con solvente-detergente se diluye primero para reducir la

40
concentración iónica a una que es apropiada para enlazar la protrombina y el factor X sobre el intercambiador aniónico. Los medios de intercambio aniónico apropiados están disponibles comercialmente e incluyen DEAE Sepharose CL6B suministrado por Amersham Biosciences y Fractogel EMD DEAE 650(S) suministrado por Merck. De preferencia, el medio de intercambio aniónico está presente en una columna para facilitar el lavado y la elución. De preferencia, si se usó un medio de intercambio aniónico durante la preparación del material iniciador, por ejemplo para la captura de protrombina y/o factor X de un material de fuente, tal como plasma, entonces se usa el mismo medio de intercambio aniónico para el proceso de la invención para minimizar la exposición a diferentes reactivos.

Después de la carga, el medio de intercambio aniónico se lava con uno o más amortiguadores de lavado apropiados para remover la proteína no unida o débilmente unida y los reactivos con solvente-detergente. Los amortiguadores de lavado deberán estar libres de reactivos que pudieran generar trombina de la protrombina unida.

La protrombina unida después se activa para formar trombina mediante la adición de iones metálicos apropiados, de preferencia iones metálicos divalentes, tales como iones de magnesio o calcio, más preferentemente iones de calcio. Pueden usarse combinaciones de más de un tipo de ión metálico

49
Z

para la activación, por ejemplo una mezcla de iones de calcio y magnesio. De preferencia, los iones metálicos se adicionan en la forma de un amortiguador de activación y están presentes en una concentración de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 40 mM, más preferentemente entre aproximadamente 1.5 y aproximadamente 17 mM, y más preferentemente aproximadamente 2 mM en el amortiguador.

La protrombina enlazada se incuba con los iones metálicos durante un tiempo suficiente y a una temperatura apropiada para que proceda la reacción de activación. La temperatura deberá ser suficientemente alta para que proceda la reacción, pero no tan alta como para que las proteínas se desnaturalicen o se induzca el crecimiento de cualesquiera microorganismos contaminantes. La reacción se lleva a cabo preferentemente en o por debajo de aproximadamente 26°C, por ejemplo a 10°-26°C, más preferentemente a aproximadamente la temperatura ambiente (20°C) o por debajo, durante aproximadamente 19-85 horas, más preferentemente 19-65 horas y aún más preferentemente durante aproximadamente 40-65 horas. Por ejemplo, las condiciones de incubación apropiadas pueden ser durante aproximadamente 65 horas a aproximadamente 20°C.

Sin ser vinculado con ninguna teoría, se cree que es la combinación de los iones metálicos (por ejemplo, calcio) y el medio de intercambio aniónico - al cual se enlaza la

protrombina lo que permite la activación de la protrombina, para formar trombina sin la necesidad de adicionar ningún agente de activación adicional, por ejemplo tromboplastina. Los iones metálicos activan el factor X en la fracción adsorbida para formar el factor Xa, y el factor Xa en cambio activa la protrombina para formar la trombina. También es posible cargar el factor X de virus inactivados con solvente-detergente sobre el medio de intercambio aniónico y activarlo para formar el factor Xa mediante la adición de iones metálicos, antes de que se adicione la protrombina al medio de intercambio aniónico. El factor Xa después convierte la protrombina a trombina sobre el medio.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un segundo método para la preparación de trombina de virus inactivado que comprende las etapas de:

(a) inactivación del virus con solvente-detergente de una solución que comprende el factor X;

(b) cargar el producto de la etapa (a) sobre un medio de intercambio aniónico;

(c) lavar el medio para remover los reactivos usados para la inactivación del virus con solvente-detergente en la etapa (a);

(d) activar el factor X en el medio para formar el factor Xa mediante la adición de iones metálicos; y

(e) cargar la protrombina de virus inactivados sobre el

b' 9/8

medio de intercambio aniónico de modo que se genere trombina.

De preferencia, la trombina después se eluye selectivamente desde el medio de intercambio aniónico. También, de preferencia los iones metálicos son iones metálicos divalentes, tal como iones de magnesio y/o calcio.

El material iniciador para el segundo proceso de la invención puede ser cualquier solución que comprenda separadamente protrombina y el factor X, incluyendo fracciones de plasma, protrombina y/o factor X derivados de la expresión génica, por ejemplo en el cultivo celular o especies transgénicas y la protrombina y/o factor X producidos por cualesquiera otros métodos sintéticos. Los materiales iniciadores pueden prepararse mediante cualquier método apropiado conocido en la técnica. Las condiciones apropiadas de inactivación del virus, carga y activación para el segundo método de la invención son como se describen anteriormente para el primer método de la invención.

Después de la activación del factor X para formar el factor Xa, el medio de intercambio aniónico puede lavarse opcionalmente usando un amortiguador apropiado para remover los iones metálicos antes de que se adicione la protrombina.

Después de la conversión de protrombina a trombina, la trombina puede recuperarse mediante la elución con un amortiguador de recuperación apropiado. La concentración iónica y el pH del amortiguador de recuperación se eligen, de

preferencia, para remover selectivamente la trombina y dejar otras proteínas, por ejemplo cualquier protrombina sin convertir, enlazada al medio de intercambio aniónico. El pH del amortiguador de recuperación usado deberá estar por debajo del pI de la trombina, de modo que la trombina no se enlace al intercambiador aniónico. Un pH apropiado para el amortiguador de recuperación es pH 8. De preferencia, los amortiguadores usados para el lavado, activación y recuperación no contienen ningunas sales de fosfato, para evitar la precipitación de fosfato de calcio insoluble durante el proceso de manufacturación.

La trombina producida es altamente purificada y concentrada y puede formularse directamente sin purificación adicional. Alternativamente, pueden llevarse a cabo si se desea etapas de purificación adicionales. Por ejemplo, la solución de trombina obtenida de los medios del intercambiador aniónico puede someterse a las etapas adicionales de reducción o inactivación del virus. Por ejemplo, la solución puede filtrarse a través de un filtro de remoción del virus, tal como un filtro Planova 15N. La filtración también puede servir para remover el agente causal de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (TSE).

Una vez que se separa del medio de intercambio aniónico, el producto de trombina puede formularse para el almacenamiento a largo plazo antes del uso clínico. De

preferencia, la solución de trombina se seca por congelado, opcionalmente en presencia de uno o más estabilizadores para ayudar a limitar la desnaturalización durante el secado por congelado, y cualquier tratamiento térmico subsecuente. Los estabilizadores apropiados incluyen carbohidratos, tales como sacarosa, rafinosa o trehalosa e iones metálicos divalentes, tales como iones de calcio. Se prefieren particularmente una combinación de iones de calcio y un carbohidrato, tal como sacarosa. De preferencia, se evita el uso de estabilizadores de proteínas, tal como albúmina para minimizar las posibles fuentes de contaminación en el producto final.

Las condiciones de secado por congelado apropiadas incluyen secado primario a una temperatura de aproximadamente -35°C y a una presión de aproximadamente 100-130 microbar (10-13 Pa), seguido del secado secundario a una temperatura de aproximadamente $+35^{\circ}\text{C}$ y a una presión de aproximadamente 30 microbar (3 Pa).

El producto de trombina secado por congelado puede someterse a una etapa de inactivación de virus adicional mediante el tratamiento térmico, por ejemplo calentando a aproximadamente 80°C durante aproximadamente 72 horas ó 100°C durante 24 horas. Una combinación de iones de calcio y un carbohidrato, tal como sacarosa, se ha encontrado que estabiliza eficientemente la trombina producida de acuerdo con la invención durante el tratamiento térmico terminal para

54

inactivar los virus.

Es deseable que los productos derivados de la sangre se sometan a por lo menos dos etapas separadas de inactivación o reducción de virus durante la manufactura. Una ventaja del proceso de la invención es que permite que se lleven a cabo múltiples etapas de inactivación o reducción de virus diferentes, para inactivar o reducir los virus cubiertos y descubiertos, y otros patógenos, por ejemplo los agentes causales de TSE. El tratamiento con solvente-detergente se conoce que corta los virus cubiertos y descubiertos con lípidos, mientras que la filtración separa las partículas en un cierto tamaño y el tratamiento térmico inactiva los virus térmicamente inestables. Es deseable incorporar múltiples etapas de inactivación o reducción que se basen en diferentes principios, para remover o reducir tantos patógenos diferentes como sea posible. En una modalidad preferida, el proceso comprende una etapa adicional de inactivación o reducción de virus, además del tratamiento con solvente-detergente. En una modalidad más preferida, el proceso comprende dos etapas adicionales de reducción o inactivación de virus, además del tratamiento con solvente-detergente. De preferencia, el proceso comprende una etapa física de remoción de virus (por ejemplo, nanofiltración) y una etapa de inactivación de virus térmica seca además del tratamiento con solvente-detergente.

45

Otras ventaja del proceso de la invención es que la activación de la protrombina y la purificación de la trombina resultante puede lograrse usando el mismo tipo de medio de intercambio aniónico como se usó anteriormente para preparar la protrombina y el material iniciador del factor X. La formulación del producto también usa reactivos que ya se han usado en el proceso de preparación. Esto minimiza la exposición de la trombina a una multiplicidad de reactivos, que es benéfica en la manufactura de un producto farmacéutico. Una ventaja adicional del proceso es que minimiza el riesgo de la integridad de otras operaciones de manufacturación planteadas por el posible contacto con la trombina proteasa altamente potente. Esto puede evitarse normalmente únicamente mediante la segregación de la planta de manufacturación de trombina de otro equipo y actividades en la industria. Tal segregación es costosa de labor intensiva. También, el procesamiento de los intermediarios de virus inactivados (por ejemplo, tratados con solvente-detergente) tiene que hacerse en un área de manufacturación separada, aislada, para evitar cualquier contaminación subsecuente. La incapacidad del arte previo de generar trombina después del tratamiento con solvente-detergente requirió el uso de espacio de manufacturación significativamente más segregado y riesgos adicionales en el manejo del producto durante la transferencia de etapa a

50 

etapa. Adicionalmente, también hubo el riesgo potencial de los empleados de manufacturación del manejo de una proteasa que pudo tener efectos trombóticos significativos si se introdujera inadvertidamente en su circulación. Estos problemas se minimizan mediante el uso del proceso de la invención porque:

(a) antes del tratamiento con solvente-detergente significa que la trombina generada no necesitó procesarse en numerosas áreas de manufacturación diferentes, cada una de las cuales tendría que ser aislada de otras actividades;

(b) se minimiza el número de etapas de manufacturación (particularmente después de la generación de trombina a partir de protrombina); y

(c) el rendimiento es suficiente para proporcionar cantidades significativas de trombina de volúmenes muy pequeños.

De esta manera, la contención del proceso se simplifica considerablemente.

También es ventajoso limitar la exposición del producto a múltiples reactivos diferentes durante la manufactura, ya que tales reactivos pueden servir como una fuente de contaminación indeseable o modificación del producto. Minimizando el número de reactivos y las etapas requeridas para la manufactura de la trombina a partir de la protrombina, es una ventaja adicional del proceso de la

57
R

invención.

La trombina preparada usando el proceso de la invención puede usarse clínicamente, ya sea sola o en combinación con fibrinógeno en un kit de cicatrización de fibrina. Por lo tanto, la presente invención proporciona la trombina obtenida de acuerdo con un proceso de la invención, para el uso en terapia, y kits farmacéuticos que comprenden la trombina obtenida de acuerdo con un proceso de la invención en combinación con fibrinógeno. Se prefieren los kits que comprenden la trombina preparada de acuerdo con un proceso de la invención y el fibrinógeno preparado de acuerdo con la solicitud del PCT co-pendiente del solicitante No. (desconocido) titulada "Processes for the preparation of fibrinogen" (Procesos para la preparación de fibrinógeno) presentada el 7 de julio de 2003, que reivindica la prioridad de la solicitud de patente UK No. 0216001.8 presentada el 10 de julio de 2002, la descripción de la cual se incorpora en la presente por referencia.

Lo siguiente es una descripción más detallada de las modalidades preferidas del proceso de la invención.

Remoción del crioprecipitado del plasma

El plasma congelado de humano se acondiciona a alrededor de -11°C , se descongela a aproximadamente $+1^{\circ}\text{C}$ y el crioprecipitado se colecta por centrifugación. El

50
↓

sobrenadante se denomina sobrenadante de crioprecipitado (CPS).

Captura del complejo de protrombina del sobrenadante de crioprecipitado

Adsorción del complejo de protrombina del sobrenadante crioprecipitado

El medio de intercambio aniónico, tal como DEAE Sepharose CL-6B, se adiciona a CPS en proporciones de, por ejemplo, -10 ml de medio de intercambio aniónico empacado por kilogramo de CPS. La mezcla se agita durante un tiempo apropiado y después el medio (incluyendo la proteína adsorbida) se recupera del CPS, por ejemplo mediante centrifugación.

Elución del complejo de protrombina

El medio de intercambio aniónico recuperado se suspende en un amortiguador apropiado y se empaca en una columna de cromatografía. El medio se lava con un amortiguador de baj contenido salino para remover las proteínas enlazadas débilmente e indeseadas. Las condiciones de carga y lavado se controlan para minimizar específicamente el nivel del factor VI de coagulación y los factores de coagulación activados en el complejo de la protrombina eluida. El medio después se lava con un amortiguador de elución de alto contenido salino

59
P
6

para recuperar el complejo de protrombina. El pico de la proteína se colecta selectivamente para evitar la contaminación del complejo de protrombina con los factores de coagulación activados. El eluato puede almacenarse congelado.

Tratamiento con solvente-detergente

La solución del complejo de protrombina se filtra a través de un filtro de poro de 0.45 μm o más pequeño. Los reactivos con solvente-detergente después se adicionan y la mezcla se agita a una temperatura y durante un tiempo conocido para activar cualesquiera virus cubiertos que pudieran estar presentes.

Cromatografía de activación de protrombina

Dilución del complejo de protrombina tratado con solvente-detergente

El complejo de protrombina tratado con solvente-detergente después se diluye con, por ejemplo, agua, para reducir la concentración iónica de la solución a una que sea apropiada para unirse sobre un intercambiador aniónico.

Carga del segundo intercambiador aniónico

La solución de la proteína diluida se bombea a través de una columna que contiene un medio de intercambio aniónico empacado. De manera ventajosa, éste puede ser el mismo medio

60
16

que el usado para la preparación de la protrombina y el factor X del CPS u otra fuente. La contaminación microbiológica durante la generación de trombina se minimiza mediante la sanitización apropiada del medio de intercambio aniónico y mediante la filtración de los amortiguadores, para remover la contaminación bacteriana (por ejemplo, mediante el uso de filtros de $0.2 \mu\text{m}$). El medio se lava con el amortiguador usado para equilibrar la columna, para remover la proteína enlazada débilmente y los reactivos con solvente-detergente, y para equilibrar el medio con las sales amortiguadoras que son más favorables para las etapas de procesamiento subsecuentes. El medio después se lava con aproximadamente 1 volumen de columna de un amortiguador que contiene calcio, por ejemplo el amortiguador de equilibrio más cloruro de calcio 2 mM.

Incubación por activación

Las salidas de la columna se cierran y la columna se mantiene a una temperatura predeterminada durante un tiempo definido, por ejemplo, 65 horas a 20°C . Durante la incubación, la protrombina se convierte a la trombina.

Recuperación de la trombina

A final de la incubación, la columna se lava con el amortiguador de equilibrio para recuperar la trombina. Las

61
2
6

proteínas no afectadas por la incubación por activación permanecen unidas al medio, ya que las condiciones usadas para este lavado, en términos de pH, componentes del amortiguador y concentración iónica, son las mismas que las usadas para el lavado después de la carga de la columna. La trombina no se une a los intercambiadores iónicos a pHs abajo de su pI, así que se lava mediante el amortiguador. Por ejemplo, a pH 8 la trombina no se une a los intercambiadores iónicos, pero su precursor, la protrombina sí.

El pico que se eluye se colecta en fracciones, los primeros volúmenes de la columna del efluente de la columna son de trombina de menor pureza y contienen más de cualquier trombina degradada o dañada que pudiera estar presente. Los siguientes volúmenes de la columna son de pureza mayor y si se separan de los volúmenes de la primera columna pueden usarse sin purificación adicional. Alternativamente, todo el efluente de la columna puede colectarse y purificarse adicionalmente.

Filtración del virus

Puede usarse una etapa de reducción del virus. El eluato de la columna que contiene trombina puede filtrarse a través de un filtro de remoción de virus validado, tal como un filtro Planova 15N. La filtración también puede remover o reducir otros patógenos, por ejemplo los agentes causales de

62
B

TSE.

Formulación

La trombina se formula y se ajusta ahora a su potencia objetivo para el almacenamiento a largo plazo antes del uso clínico. Un método recomendado es la adición de un carbohidrato, tal como sacarosa y calcio, a una concentración de cloruro de sodio objetivo y después secarse por congelado la solución. Antes del secado por congelado, el producto formulado puede filtrarse a través de un filtro esterilizado (por ejemplo, un filtro de 0.2 μm) conforme se requiera para el uso farmacéutico.

Tratamiento térmico terminal

La formulación secada por congelado puede tratarse con calor terminalmente para inactivar cualesquiera virus que pudieran estar presentes.

La trombina preparada usando el proceso de la invención puede usarse clínicamente, ya sea sola o en combinación con fibrinógeno en un kit de cicatrización de fibrina. Por lo tanto, la presente invención también proporciona la trombina obtenida de acuerdo con el proceso de la invención, para el uso en terapia, y kits farmacéuticos que comprenden la trombina obtenida de acuerdo con el proceso de la invención en combinación con fibrinógeno. Se prefieren los kits que

comprenden trombina, de acuerdo con el proceso de la invención y el fibrinógeno preparado de acuerdo con la solicitud de patente co-pendiente del Reino Unido del solicitante titulada "Process and Composition" (Proceso y Composición) presentada el 10 de julio de 2002.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

La preparación de PCC se describe en: Feldman P A, Bradbury P I, Williams J D, Sims G E C, McPhee J W, Pinnell M A, Harris L, Crombie G I, Evans D R, "Large scale preparation and biochemical characterisation of a new high purity factor IX concentrate prepared by metal chelate affinity chromatography", Blood Coagulation and Fibrinolysis 1994; 5:939-948.

El pH de las soluciones se ajustó usando las concentraciones apropiadas de hidróxido de sodio para aumentar el pH o ácido clorhídrico para reducir el pH.

La trombina se midió mediante la prueba de coagulación que mide el tiempo para coagular una muestra de fibrinógeno y/o por la prueba cromogénica que mide la absorbancia de un cromóforo liberado por el corte mediado por la trombina de un péptido sintético. Tales métodos de prueba son conocidos por los experimentados en la técnica.

62
46

Prueba de coagulación de trombina

El estándar se calibra contra un estándar aceptado internacionalmente, y se diluye en el amortiguador de prueba, tal como trometamol 50 mM, cloruro de sodio 100 mM, albúmina al 1%, pH 7.5, a un intervalo de concentraciones apropiado, por ejemplo, 1 a 7 iu/ml. Las muestras se diluyen para estar dentro del intervalo de concentraciones.

Los tiempos de coagulación de las soluciones de trombina diluidas se miden después de la adición de fibrinógeno humano a una concentración fijada. La relación entre las muestras de prueba y el estándar después permite el cálculo de la concentración de trombina en la muestra, expresada en unidades internacionales (iu) por ml.

Prueba cromogénica de trombina

El estándar se calibra contra un estándar aceptado internacionalmente, y se diluye en el amortiguador de prueba, tal como trometamol 50 mM, cloruro de sodio 100 mM, albúmina al 0.1%, pH 7.3, a un intervalo de concentraciones apropiado, por ejemplo, 0.5 a 5 iu/ml. Las muestras se diluyen para estar dentro del intervalo de concentraciones.

La trombina diluida después se adiciona a un sustrato cromogénico (por ejemplo S-2238 de Chromogenix) y la mezcla se incuba durante un periodo de tiempo definido. La reacción después se detiene mediante la adición de, por ejemplo, ácido

65
10

acético. La absorbancia de la solución después se mide a 405 nm (para S-2238). La concentración de la trombina es proporcional al color desarrollado y la concentración de la muestra puede interpolarse de la línea estándar.

Ejemplo 1: Cromatografía de activación de protrombina

Amortiguadores de trometamol e incubación a 20°C durante 62.5 horas.

1.19 kg del complejo de protrombina tratado con solvente-detergente se diluyó con 2.50 kg de agua para reducir su conductividad de 26.4 mS/cm a 9.28 mS/cm. La solución después se tituló a pH 8.0. Esta solución se cargó en una columna enchaquetada de 5 cm de diámetro empacada con un lecho de 13 cm de altura de DEAE Sepharose CL6B, equilibrado con trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, pH 8.0. Después de cargar, el medio se lavó con 15 volúmenes de columna de trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, pH 8.0 para remover los reactivos del solvente-detergente y la proteína débilmente enlazada. El medio después se lavó con 1 volumen de columna de trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, cloruro de calcio 2 mM, pH 8.0. Las salidas de la columna se cerraron. Se circuló agua a 20°C a través de la chaqueta.

Después de 62.5 horas, se detuvo la circulación del agua. El medio se lavó con trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, pH 8.0 para recuperar la trombina generada durante la

66
7/9

incubación. Los primeros 3 volúmenes de la columna del efluente de la columna que contuvieron 3.8 millones de unidades internacionales (iu) de actividad de coagulación de trombina, se desecharon ya que la actividad de coagulación específica fue menor de 2000 iu/mg de proteína total. Los siguientes 11 volúmenes de la columna del efluente que contuvieron 2.8 millones iu de actividad de coagulación, tuvieron una actividad específica de 2400 iu/mg y se acumularon para el procesamiento adicional, sin la necesidad de etapas de purificación adicionales de la proteína.

Ejemplo 2: Cromatografía de activación de protrombina

Amortiguadores de citrato-fosfato y DEAE Sepharose

4.4 kg del complejo de protrombina tratado con solvente-detergente se diluyó con 6.3 kg de agua para reducir su conductividad a 9.3 mS/cm. La solución después se tituló a pH 8.0. Se cargaron 7.1 kg de esta solución sobre una columna de 9 cm de diámetro empacada con un lecho de 12.5 cm de altura de DEAE Sepharose CL6B, equilibrado con citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 68.5 mM, pH 8.0. Después de cargar, el medio se lavó con 11 volúmenes de columna de citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 68 mM, pH 8.0 para remover los reactivos del solvente-detergente y la proteína débilmente enlazada. El medio después se lavó con 1 volumen de columna de citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio

67
68

64 mM, cloruro de calcio 2 mM, pH 8.0. Las salidas de la columna se cerraron. La columna se almacenó a temperatura ambiente.

Después de aproximadamente 64 horas, el medio se lavó con citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 68 mM, pH 8.0 para recuperar la trombina generada durante la incubación. Se recuperaron un total de 11 millones iu de la actividad de coagulación de la columna, de los cuales 3.8 millones iu tuvieron una actividad específica de >2000 iu/mg y se acumularon para el procesamiento adicional, sin la necesidad de etapas de purificación adicionales de la proteína.

Ejemplo 3: Cromatografía de activación de protrombina

Amortiguadores de citrato-fosfato y Fractogel EMD DEAE 650(S)

148 ml del complejo de protrombina tratado con solvente-detergente se diluyó con 121 ml de citrato 8 mM, fosfato 10 mM, pH 9.0 para reducir su conductividad a 16 mS/cm. La solución después se tituló a pH 8.0. Se cargaron 111 g de esta solución sobre una columna de 1 cm de diámetro empacada con 10 ml de Fractogel EMD DEAE 650(S), equilibrado con citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 137 mM, pH 8.0. Después de cargar, el medio se lavó con 12 volúmenes de columna de citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 137 mM, pH 8.0, para remover los reactivos con solvente-

60
5
16

detergente y la proteína débilmente enlazada. El medio después se lavó con 1 volumen de columna de citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 129 mM, cloruro de calcio 2 mM, pH 8.0. Las salidas de la columna se cerraron. La columna se almacenó a temperatura ambiente.

Después de aproximadamente 64 horas, el medio se lavó con citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 129 mM, cloruro de calcio 2 mM, pH 8.0 para recuperar la trombina generada durante la incubación. Un total de 0.4 millones iu de actividad de coagulación se recuperaron de la columna, de los cuales 0.3 millones iu tuvieron una actividad específica de >2000 iu/mg y se acumularon para el procesamiento adicional, sin la necesidad de etapas de purificación adicionales de la proteína.

Ejemplo 4

Amortiguadores de trometamol e incubación a 10, 14.5 y 22°C durante aproximadamente 64 horas.

195 g del complejo de protrombina tratado con solvente-detergente se diluyó con 424 g de agua, para reducir su conductividad de 28.9 mS/cm a 9.39 mS/cm. La solución después se tituló a pH 8.0 con hidróxido de sodio 1M. Se cargaron aproximadamente 140 g de esta solución sobre tres columnas enchaquetadas de 1 cm de diámetro empacadas con un lecho de 13 de altura de DEAE Sepharose CL6B, equilibrado con

69
P

trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, pH 8.0. Después de cargar, el medio se lavó con 10 volúmenes de columna de trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, pH 8.0, para remover los reactivos con solvente-detergente y la proteína débilmente enlazada. El medio después se lavó con 1 volumen de columna de trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, cloruro de calcio 2 mM, pH 8.0. Las salidas de la columna se cerraron. Una columna se dejó a temperatura ambiente ($21.8^{\circ}\text{C} \pm 0.4^{\circ}\text{C}$). Las otras se mantuvieron a 10° ó 14.5°C circulando agua enfriada a través de las chaquetas de la columna.

Después de aproximadamente 64 horas, la temperatura en las chaquetas se cambió a 18°C y se detuvo el enfriamiento de la chaqueta. El medio se lavó con trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, pH 8.0 para recuperar la trombina generada durante la incubación. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

20
7/4

Tabla 1

Columna	Temperatura de incubación, °C	Actividad de coagulación de la trombina	
		Recuperado total, iu	Total >2000 iu/mg, iu
1	10	212,000	149,000
2	14.5	293,000	174,000
3	22	353,000	142,000

Ejemplo 5

Amortiguadores de trometamol e incubación a 15, 23 y 26°C durante aproximadamente 64 horas.

458 g del complejo de protrombina tratado con solvente-detergente se diluyó con 977 g de agua para reducir su conductividad de 28.9 mS/cm a 9.39 mS/cm. La solución después se tituló a pH 8.0 con hidróxido de sodio 1M. Aproximadamente 140 g de esta solución se cargó sobre tres columnas enchaquetadas de 1.6 cm de diámetro empacadas con lecho de 13 cm de altura de DEAE Sepharose CL6B, equilibrado con trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, pH 8.0. Después de cargar, el medio se lavó con 10 volúmenes de columna de trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, pH 8.0 para remover los reactivos con solvente-detergente y la proteína

1471

débilmente enlazada. El medio después se lavó con 1 volumen de columna de trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, cloruro de calcio 2 mM, pH 8.0. Las salidas de la columna se cerraron. Después se circuló agua a través de las chaquetas de la columna a 15°, 23° y 26°C.

Después de 65 horas, se detuvo la circulación de agua. El medio se lavó con trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, pH 8.0, para recuperar la trombina generada durante la incubación. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Columna	Temperatura de incubación, °C	Actividad de coagulación de la trombina	
		Recuperado total, iu	Total >2000 iu/mg, iu
1	15	864,000	423,000
2	23	756,000	284,000
3	26	800,000	128,000

Ejemplo 6

Amortiguadores de trometamol e incubación a temperatura ambiente durante 16, 40 y 64 horas.

248 g del complejo de protrombina tratado con solvente-

22

detergente se diluyó con 523 g de agua para reducir su conductividad de 28.9 mS/cm a 9.33 mS/cm. La solución después se tituló a pH 8.0. Aproximadamente 195 g de esta solución se cargó sobre cada una de tres columnas de 1 cm de diámetro empacadas con lecho de 13 cm de altura de DEAE Sepharose CL6B, equilibrado con trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, pH 8.0. Después de cargar cada columna, el medio se lavó con 10 volúmenes de columna de trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, pH 8.0 para remover los reactivos con solvente-detergente y la proteína débilmente enlazada. El medio después se lavó con 1 volumen de columna de trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 8.0. Las salidas de la columna se cerraron. La columna se almacenó a temperatura ambiente.

Las tres columnas se almacenaron durante 16 horas, 40 horas y 64 horas. Al final de cada incubación, el medio se lavó con trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, pH 8.0 para recuperar la trombina generada durante la incubación. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

23
X

Tabla 3

Columna	Incubación, horas	Actividad de coagulación de la trombina	
		Recuperado total, iu	Total >2000 iu/mg, iu
1	16	30,700	0
2	40	407,000	197,000
3	64	500,000	158,000

Ejemplo 7: Mecanismo de generación de trombina

Se realizaron experimentos para determinar el mecanismo de activación de la protrombina a trombina en el proceso de la invención.

Materiales

Protrombina purificada con virus inactivados

Factor X purificado con virus inactivados

Antitrombina con virus inactivados

La protrombina y el factor X se habían inactivado por tratamiento con solvente y detergente usando fosfato de tri-n-butilo y polisorbato 80. La antitrombina se había inactivado de virus por tratamiento térmico.

74

Método

Se empacaron tres columnas de cromatografía con el gel de intercambio aniónico DEAE Sepharose CL-6B y se equilibraron en amortiguador de trometamol-NaCl. Las tres columnas después se usaron como se describe en la Tabla 4, y los productos después se probaron para la actividad de trombina.

Tabla 4

Columna 1	Columna 2	Columna 3
Protrombina cargada	Factor X cargado	Factor X cargado
Equilibrio	Equilibrio	Equilibrio
Lavado con	Lavado con	Lavado con
Amortiguador	Amortiguador	Amortiguador
Incubación con	Incubación con	Incubación con
amortiguador de	amortiguador de	amortiguador de
calcio	calcio	calcio
Equilibrio	Equilibrio	Equilibrio
Elución con	Lavado con	Lavado con
amortiguador	amortiguador	amortiguador
	Protrombina cargada	Antitrombina cargada

Columna 1	Columna 2	Columna 3
	Equilibrio Elución con amortiguador	Equilibrio Lavado con amortiguador Protrombina cargada Equilibrio Elución con amortiguador

Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

	Columna 1	Columna 2	Columna 3
Protrombina total cargada, iu	2039	2044	2061
Factor X total cargado aplicado, u	0	1222	1196
Antitrombina aplicada, u	0	0	850

26

	Columna 1	Columna 2	Columna 3
Trombina generada, iu por iu de protrombina	<0.07	113	<0.07

Los resultados muestran que la trombina no puede generarse a partir de la protrombina con virus activados exclusivamente por el calcio (Columna 1). La trombina puede generarse a partir de protrombina con virus inactivados por incubación con el factor X con virus inactivados, el cual se ha incubado anteriormente con calcio, y el calcio después se remueve antes del contacto con la protrombina (Columna 2). La trombina no puede generarse a partir de protrombina con virus inactivados por incubación con el factor X con virus inactivados, el cual se ha incubado anteriormente con calcio, si el factor X/factor Xa después se inactiva con antitrombina y el calcio y la antitrombina se remueven antes del contacto con la protrombina (Columna 3).

El mecanismo de generación de trombina en el proceso de la invención requiere que el factor X sea activado por el calcio y la protrombina para después activarse a la trombina mediante la acción del factor X activado (es decir, el factor Xa), en lugar de directamente por el calcio. Por lo tanto, la protrombina aislada no es un material iniciador apropiado para

27.7

el uso en el proceso de la invención.

Ejemplo 8: Carencia de generación de trombina usando únicamente protrombina purificada y calcio

La protrombina (Factor II) se separó de otras proteínas del factor de coagulación del complejo de protrombina después del tratamiento virucida con solvente y detergente, mediante el paso a través de una columna Chelating Sepharose cargada con cobre.

Esta solución de proteína se usó en presencia del solvente de co-purificación y los reactivos detergentes (SD) o se separó del solvente y los reactivos detergentes mediante re-cromatografía en un gel de intercambio aniónico de DEAE Sepharose.

La protrombina en solución se incubó a pH 6.5 con amortiguador de cloruro de calcio 40 mM a 25°C durante 3 horas. Después se midió la actividad de la trombina.

Los resultados se muestran en la Tabla 6.

27/78

Tabla 6

Muestras	Actividad de trombina después de 3 horas, iu/ml
Protrombina con SD	Menos de 0.05
Protrombina después de la remoción de SD	Menos de 0.05

Los resultados confirman que la protrombina aislada de humano no se convirtió en trombina mediante la acción de iones de calcio únicamente después de experimentar un procedimiento de inactivación de virus con solvente-detergente, sin tener en cuenta si los reactivos de SD se removieron o no antes de la adición de los iones de calcio. Por lo tanto, la protrombina aislada no es un material iniciador apropiado, para el uso en el proceso de la invención.

Ejemplo 9: Carencia de generación de trombina por la acción del calcio sobre el complejo de protrombina durante o después del tratamiento con reactivos de solvente-detergente.

Muestras de tres concentrados diferentes del complejo de protrombina (que contienen los factores II, IX y X) se incubaron con cloruro de calcio 20 mM en solución y se probaron para la actividad de trombina después de la

P29

incubación durante 3 horas y 5 horas.

Las muestras del complejo de protrombina (PCC) derivadas de plasma de humano fueron:

A: eluato de PCC de cromatografía de intercambio aniónico de CPS.

B: eluato de PCC que contiene detergente de polisorbato 80 al 1% y solvente de fosfato de tri-n-butilo (TnBP) al 0.3%.

C: PCC tratado con solvente y detergente del cual se ha removido el solvente y el detergente.

Ninguno de los materiales del complejo de protrombina usados en estos experimentos, se activaron durante su manufactura, ya sea intencional o no intencionalmente, como se determina por las pruebas NAPTT y FCT para los factores de coagulación activados.

Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Muestra	Trombina después de 3 horas, iu/ml	Trombina después de 5 horas, iu/ml
A	619	1168
B	Menos de 1	3.48
C	Menos de 1	2.02

100

Los resultados muestran que se generó trombina despreciable del complejo de protrombina (no activada) en solución después de que se había tratado con solvente y detergente, sin tener en cuenta si el solvente y detergente permaneció en la preparación en el momento de la incubación con calcio (comparar los resultados para la muestra A con los de las muestras B y C). Esto confirmó la enseñanza del arte previo que el calcio solo no fue suficiente para activar el complejo de protrombina tratado con solvente-detergente. Es una característica esencial del proceso de la invención que la protrombina tratada con solvente-detergente que contiene el material, se carga sobre un medio de intercambio aniónico para que se genere trombina.

Ejemplo 10

Activación con iones de calcio y magnesio

249 ml del complejo de protrombina tratado con solvente-detergente se diluyó con 150 ml de agua desionizada para reducir su conductividad a 16 mS/cm. La solución después se tituló a pH 8.0 con hidróxido de sodio 1M. 82 a 87 g de esta solución se cargaron en cada una de tres columnas de 1 cm de diámetro, cada una empacada con 10 ml de DEAE Sepharose CL6B, equilibrado con citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 137 mM, pH 8.0. Después de cargar, el medio se lavó con 10 volúmenes de columna de citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro

2281

de sodio 137 mM, pH 8.0, para remover los reactivos de solvente y detergente y la proteína débilmente enlazada. El medio después se lavó con 1 volumen de columna de amortiguador de activación, ya sea citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 129 mM, cloruro de calcio 2 mM, pH 8.0 (columna 1) o citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 129 mM, cloruro de magnesio 2 mM, pH 8.0 (columna 2) o citrato 8 mM, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 129 mM, cloruro de calcio 2 mM, cloruro de magnesio 2 mM, pH 8.0 (columna 3). Las salidas de la columna se cerraron. Las columnas se almacenaron a temperatura ambiente.

Después de aproximadamente 64 horas, el medio se lavó con el amortiguador de activación para recuperar la trombina generada durante la incubación. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Columna	Actividad cromogénica de trombina total recuperada	Ión metálico en el amortiguador de activación
1	178,000 iu	Calcio
2	66,500 iu	Magnesio
3	256,000 iu	Calcio/Magnesio

B2
M
2Ejemplo 11: Formulaci3n

Una soluci3n de trombina en la que se filtr3 el virus preparada como en el Ejemplo 1, se formul3 a trometamol 10 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 40 mM, s3carosa al 2%, pH 7.0 y se ajust3 la potencia a aproximadamente 500 iu de actividad de coagulaci3n de trombina/ml.

5 ml de esta soluci3n se reparti3 en ampolletas de vidrio y se secaron por congelado. El material secado por congelado se trat3 con calor a 80°C durante 72 horas. En 3 corridas, se alcanz3 un promedio de recuperaci3n de 98% para la actividad de coagulaci3n de trombina por medio del secado por congelado y un promedio de 98% por medio del tratamiento t3rmico.

Ejemplo 12: Formulaci3n

Se formul3 la soluci3n de trombina a aproximadamente 1250 iu de actividad de coagulaci3n/ml. Todas las formulaciones contuvieron trometamol 10 mM y cloruro de sodio 200 mM a pH 7.0. Adicionalmente, contuvieron los componentes adicionales mostrados a continuaci3n. Las soluciones se llenaron en ampolletas, 2 ml por ampolleta. Las ampolletas se secaron por congelado y se trataron con calor seco a 80°C durante 72 horas. Las ampolletas despu3s se reconstituyeron con agua y se probaron para determinar la actividad de trombina. La actividad de trombina se compar3 con la

27/83

actividad de trombina en las muestras tomadas antes del secado por congelado. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

[Cloruro de calcio], mM	Componentes adicionales	Recuperación de la actividad de coagulación a través del tratamiento de secado por congelado y térmico
2	-	59%
10	-	69%
40	-	88%
2	Sacarosa al 1%	88%
2	Sacarosa al 2%	93%
2	Trehalosa al 1%	98%
2	Rafinosa al 1%	88%
2	Albúmina de humano al 1%	60%
2	PEG 4000 al 1%	78%

Los resultados mostraron que el estabilizador de albúmina convencional no proporcionó estabilidad a través del

L 84
A 84

tratamiento de secado por congelado y térmico. Otras combinaciones del calcio y carbohidrato dieron estabilidad mejorada a través del tratamiento de secado por congelado y térmico.

Ejemplo 13: Formulación de trombina, tratamiento de secado por congelado y térmico

Se formuló una solución de trombina a 500 iu/ml (5 ml de llenado). Todas las formulaciones también contuvieron trometamol 10 mM y sodio 200 mM a pH 7.0 y contuvieron adicionalmente los componentes mostrados a continuación. Las soluciones se llenaron en ampolletas, 5 ml por ampolleta. Las ampolletas se secaron por congelado y se trataron con calor a 80°C durante 72 horas ó 100°C durante 24 horas. Las ampolletas después se reconstituyeron con agua y se probaron para determinar la actividad de trombina. La actividad de trombina se comparó con la actividad de trombina en las muestras tomadas antes del secado por congelado. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

85

Tabla 10

[Cloruro de calcio], mM	Componentes adicionales	Volumen de llenado, ml	Recuperación de la actividad de coagulación a través del tratamiento de secado por congelado y térmico	
			80°C/72 horas	100°C/24 horas
2	Sacarosa al 2%	5	79%	-
40	Sacarosa al 2%	5	97%	89%
2	Trehalosa al 1%	5	92%	73%

Los resultados mostraron que la formulación óptima fue de trometamol 10 mM y sodio 200 mM a pH 7.0 más cloruro de calcio 40 mM y sacarosa al 2%.

Ejemplo 14: Preparación de trombina

1.17 kg del complejo de protrombina tratado con solvente-detergente se diluyó con 2.58 kg de agua para reducir su conductividad de 27.5 mS/cm a 9.12 mS/cm. La solución después se tituló a pH 8.0 con hidróxido de sodio 0.5 M. Esta solución se cargó en una columna enchaquetada de

2786

5 cm de diámetro empacada con un lecho de 13 cm de altura de DEAE Sepharose CL6B, equilibrado con trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, pH 8.0. Después de cargar, el medio se lavó con 15 volúmenes de columna de trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, pH 8.0 para remover los reactivos de solvente-detergente y la proteína débilmente enlazada. El medio después se lavó con 1 volumen de columna de trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, cloruro de calcio 2 mM, pH 8.0. Las salidas de la columna se cerraron. Se recirculó agua a 20°C a través de la chaqueta de la columna.

Después de 64 horas, la circulación del agua se detuvo. El medio se lavó con trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, pH 8.0 para recuperar la trombina generada durante la incubación. Los primeros 4 volúmenes del efluente de la columna contuvieron 4.3 millones de unidades internacionales (iu) de actividad de coagulación de trombina con una actividad de coagulación de trombina específica menor de 2000 iu/mg de proteína total. Los siguientes 9 volúmenes del efluente de la columna que contuvieron 2.2 millones iu de actividad de coagulación a una actividad específica de 2100 iu/ml se congelaron a -40°C y se mantuvieron para el procesamiento adicional.

900 g del eluato congelado se descongeló y se filtró usando un filtro para virus Planova 15N, que se había equilibrado con trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, pH

P. 87

8.0. Hubo una recuperación medida de 95% de la actividad de coagulación de trombina a través del congelado/descongelado y 102% a través de la filtración del virus.

El filtrado después se formuló a trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, cloruro de calcio 40 mM, sacarosa al 2%, mediante la adición de un amortiguador apropiado. La solución se diluyó a una concentración de actividad de coagulación de trombina estimada de 550 iu/ml con trometamol 10 mM, cloruro de sodio 200 mM, cloruro de calcio 40 mM, sacarosa al 2%, pH 7.0 y después se tituló con ácido clorhídrico 0.5 M a pH 7.0.

Esta solución después se filtró a través de un filtro de esterilización de 0.2 μ m y después se llenó en ampolletas, 5 g de solución por ampolleta. Las ampolletas se secaron por congelado y después se trataron con calor seco a 80°C durante 72 horas. Hubo una medida de recuperación de 97% de la actividad de coagulación de trombina a través de la filtración esterilizada, 102% a través de la liofilización y 100% a través del tratamiento con calor seco.

Ejemplo 15: Tiempos de incubación

150 ml del complejo de protrombina tratado con solvente-detergente se diluyó con agua para reducir su conductividad a aproximadamente 9.3 mS/cm. La solución después se tituló a pH 8.0. Esta solución se cargó en cada una de cuatro columnas

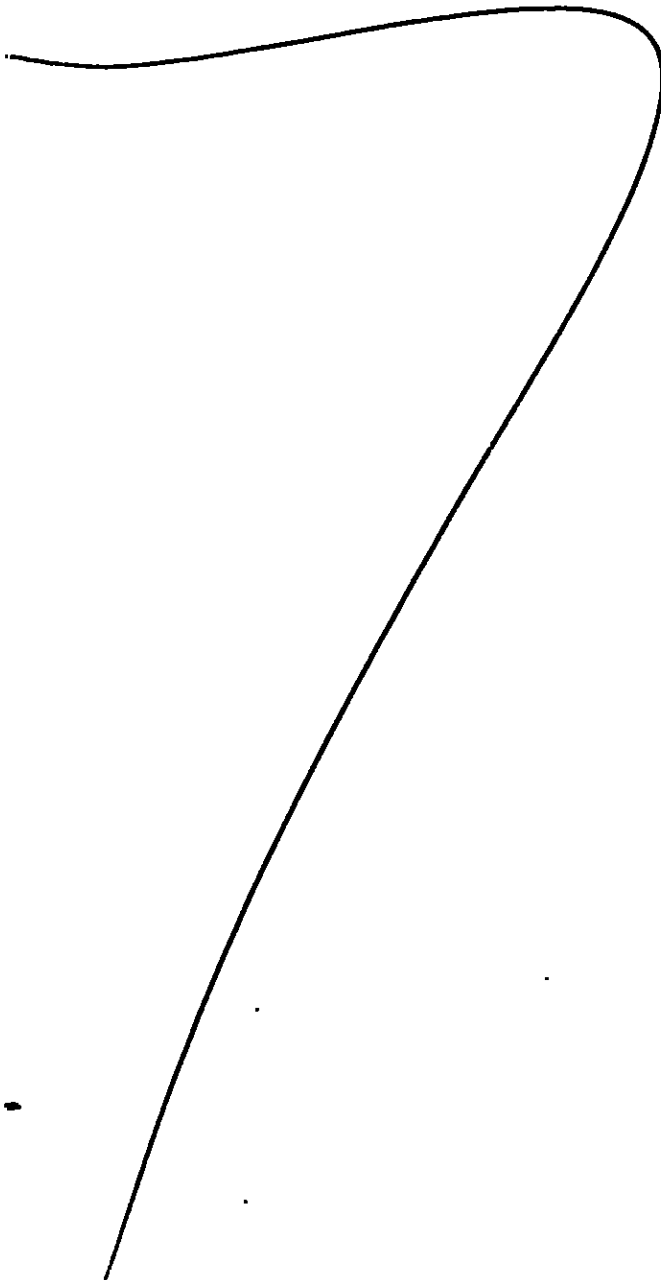
empacadas con un 12.5-12.9 mL de DEAE Sepharose CL6B, que había sido equilibrado con trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, pH 8.0. Las columnas después se lavaron con el mismo amortiguador para remover los reactivos de solvente-detergente y la proteína débilmente enlazada. Las columnas después se lavaron con trometamol 10 mM, cloruro de sodio 110 mM, cloruro de calcio 2 mM, pH 8.0, las salidas de las columnas se cerraron y las columnas se aislaron a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) durante periodos entre 35 y 85 horas. Al final de cada periodo, una de las columnas se lavó con trometamol 10 mM, NaCl 110 mM, pH 8.0 para recuperar la trombina generada. Los resultados se muestran en la Tabla 11:

Tabla 11

Columna	Incubación (horas)	Actividad de coagulación de trombina	
		Recuperado total (iu)	Total >2000 iu/mg (iu)
1	35	229,344	144,751
2	45	267,860	144,463
3	65	289,359	128,578
4	85	266,844	101,687

089

Hay una tendencia general de aumento en el rendimiento (unidades totales), pero disminución de la pureza (unidades >2000 iu/mg) con aumento en el tiempo de incubación. Una persona experimentada puede elegir el tiempo de incubación para dar el balance más favorable entre el rendimiento total y la pureza en cualquier situación particular.



X/90

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de trombina con virus inactivados, caracterizado porque comprende las etapas de:

(a) inactivación del virus con solvente-detergente de una solución que comprende protrombina y factor X;

(b) cargar el producto de la etapa (a) sobre un medio de intercambio aniónico;

(c) lavar el medio para remover los reactivos usados para la inactivación del virus con solvente-detergente en la etapa (a); y

(d) activar la protrombina sobre el medio para formar trombina mediante la adición de iones metálicos.

2. Un método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la solución que comprende la protrombina y el factor X es un complejo de protrombina.

3. Un método para la preparación de trombina con virus inactivados, caracterizado porque comprende las etapas de:

(a) inactivación del virus con solvente-detergente de una solución que comprende el factor X;

(b) cargar el producto de la etapa (a) sobre un medio de intercambio aniónico;

(c) lavar el medio para remover los reactivos usados para la inactivación del virus con solvente y detergente en la etapa (a);

(d) activar el factor X sobre el medio para formar el

91
22

factor Xa mediante la adición de iones metálicos; y

(e) cargar la protrombina con virus inactivados sobre el medio de intercambio aniónico de modo que se genere trombina.

4. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque los iones metálicos son iones metálicos divalentes.

5. Un método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque los iones metálicos divalentes son iones de magnesio y/o calcio.

6. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque comprende además la etapa de:

(e) eluir selectivamente la trombina del medio de intercambio aniónico

7. Un método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque además comprende las etapas de:

(f) pasar el producto de la etapa (e) a través de un filtro que mantiene patógenos;

(g) adicionar un ión metálico divalente y un carbohidrato al producto de la etapa (f), y

(h) secar por congelado y tratar con calor el producto de la etapa (g) para inactivar los virus.

8. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque las etapas (a) y (b) se reemplazan por las etapas (a') y (b'):

92
J

(a') cargar una solución que comprende protrombina y el factor X sobre un medio de intercambio aniónico; y

(b') inactivación del virus con solvente-detergente de la protrombina y el factor X sobre el medio.

9. La trombina, caracterizada porque se prepara de acuerdo con el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. La trombina, caracterizada porque se prepara de acuerdo con el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para uso en terapia.

11. Una formulación farmacéutica, caracterizada porque comprende la trombina preparada de acuerdo con el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

12. Un kit farmacéutico, caracterizado porque comprende la trombina preparada de acuerdo con el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 junto con fibrinógeno.

13. Un kit de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el fibrinógeno se prepara por un método que comprende las etapas de:

(a) cargar una solución que comprende fibrinógeno sobre una matriz de cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados bajo condiciones de modo que el fibrinógeno se enlaza a la matriz, y

(b) eluir selectivamente el fibrinógeno de la matriz.

4793

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención describe un método para la preparación de trombina con virus inactivados que comprende inactivación de virus con solvente y detergente de una solución que comprende protrombina y factor X, cargar la protrombina y el factor X de virus inactivados sobre un medio de intercambio aniónico, lavar el medio para remover los reactivos usados para la inactivación de virus con solvente y detergente y activar la protrombina sobre el medio para formar trombina mediante la adición de iones metálicos, de preferencia iones de calcio. La trombina después se eluye, de preferencia selectivamente desde el medio de intercambio aniónico.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/60 03/02942

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/74 A61K38/36 G01N33/86 A61K38/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 543 178 A (BEHRINGWERKE AG) 26 May 1993 (1993-05-26)	9-13
Y	see in particular page 2 line 24-42, claim 1, 9-10	1-7
X	EP 0 439 156 A (WARNER LAMBERT POTTERY ROAD LI) 31 July 1991 (1991-07-31)	9-13
Y	claims 1, 7 and 10. page 3	1-7
X	EP 1 136 084 A (AVENTIS BEHRING GMBH) 26 September 2001 (2001-09-26)	9-13
A	page 3-5; claims 1,14	1-7
	-/-	

☒ Further documents are listed in the 'continuation of box C.'

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art.
- *S* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 October 2003

Date of mailing of the international search report

03/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Vix, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 03/02942

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 71153 A (BIO PROD & BIO ENG AG ;EIBL JOHANN (AT)) 30 November 2000 (2000-11-30) see also page 10 and 14 claims 1,27	9-13
Y	EP 0 565 511 A (IMMUNO AG) 13 October 1993 (1993-10-13) see page 2 lines 14-47, page 3 lines 5-44	1-7
A	GOLDSACK, NEIL ET AL.: "Molecules in focus thrombin" INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, vol. 30, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 641-646, XP002257653 ISSN: 1357-2725 the whole document	9-13

INTERNATIONAL SEARCH REP RT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/GB 03/02942

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0543178	A	26-05-1993	DE 4137996 A1 27-05-1993
			AT 162218 T 15-01-1998
			AU 658238 B2 06-04-1995
			AU 2850292 A 20-05-1993
			CA 2083243 A1 20-05-1993
			DE 59209133 D1 19-02-1998
			DK 543178 T3 14-09-1998
			EP 0543178 A2 26-05-1993
			ES 2113910 T3 16-05-1998
			GR 3026253 T3 29-05-1998
			JP 5194261 A 03-08-1993
			KR 261360 B1 01-07-2000
			NO 924453 A 20-05-1993
			US 5723123 A 03-03-1998
EP 0439156	A	31-07-1991	IE 900266 A1 31-07-1991
			AT 140026 T 15-07-1996
			CA 2034826 A1 25-07-1991
			DE 69120550 D1 08-08-1996
			EP 0439156 A1 31-07-1991
			JP 3276964 B2 22-04-2002
			JP 4211372 A 03-08-1992
			US 5151355 A 29-09-1992
			ZA 9100500 A 27-11-1991
EP 1136084	A	26-09-2001	DE 10012732 A1 20-09-2001
			AU 2804201 A 20-09-2001
			CA 2340863 A1 18-09-2001
			EP 1136084 A1 26-09-2001
			JP 2001261574 A 26-09-2001
			US 2001033837 A1 25-10-2001
WO 0071153	A	30-11-2000	WO 0071153 A2 30-11-2000
			AU 5198600 A 12-12-2000
			CA 2372929 A1 30-11-2000
			EP 1183043 A2 06-03-2002
			EP 1275397 A2 15-01-2003
			HU 0200856 A2 29-07-2002
			JP 2003500364 T 07-01-2003
			NO 20015510 A 12-11-2001
			SK 16332001 A3 09-05-2002
			US 2002114796 A1 22-08-2002
EP 0565511	A	13-10-1993	AT 397390 B 25-03-1994
			AT 71292 A 15-08-1993
			AT 181358 T 15-07-1999
			AU 3562393 A 07-10-1993
			CA 2092776 A1 07-10-1993
			CZ 9300538 A3 19-01-1994
			DE 59309646 D1 22-07-1999
			DK 565511 T3 06-12-1999
			EP 0565511 A1 13-10-1993
			ES 2134834 T3 16-10-1999
			FI 931553 A 07-10-1993
			HU 69604 A2 28-09-1995
			JP 2832129 B2 02-12-1998
			JP 6098791 A 12-04-1994
			NO 931224 A 07-10-1993

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/GB 03/02942

97
28

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0565511	A	PL 298390 A1	18-10-1993
		SK 30993 A3	10-11-1993
		US 5432062 A	11-07-1995
		US 5792623 A	11-08-1998

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/GB03/02942

A. CLASIFICACION DEL TEMA

IPC7 C12N9/74 A61K38/46 G01N33/86 A61K38/48

De acuerdo a la Clasificación de Patentes Internacional (IPC) o a la clasificación nacional y a la IPC.

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido por los símbolos de clasificación):

IPC 7 C12N A61K

Documentación buscada diferente a la documentación mínima, a la extensión que tales documentos están incluidos en los campos buscados:

Base de datos electrónicos consultados durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, en donde sea práctico, términos de búsqueda utilizados):

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERA QUE SON RELEVANTES

Categoría	Cita del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para la Reiv. No.
X	EP 0 543 178 A (BEHRINGWERKE AG) 26 de mayo de 1993 (1993-05-26)	9-13
Y	ver en particular la página 2 línea 24-42, reivindicación 1, 9-10	1-7

X	EP 0 439 156 A (WARNER LAMBERT POTTERY ROAD LI) 31 de julio de 1991 (1991-07-31)	9-13
Y	reivindicaciones 1, 7 y 10, página 3	1-7

X	EP 1 136 084 A (AVENTIS BEHRING GMBH) 26 de septiembre de 2001 (2001-09-26)	9-13
A	página 3-5; reivindicaciones 1, 14	1-7

	-/--	

☒ Documentos adicionales se listan en la continuación del bloque C ☒ Véase familia de patentes anexa.

* Categorías especiales de los documentos citados

"A" documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera ser de particular relevancia.

"E" documento anterior publicado en o después de la fecha de presentación internacional.

"L" documento el cual puede arrojar dudas sobre la(s) reivindicación(es) de prioridad o el cual se cita para establecer la fecha de publicación de otra cita u otra razón especial (como se especifica)

"O" documento que se refiere a una descripción oral, uso, exhibición u otro medio

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y no en conflicto con la solicitud, pero citado para entender el principio o teoría fundamental de la invención.

"X" documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede ser considerada nueva o no se puede considerar que involucre una etapa inventiva cuando el documento es considerado de manera aislada.

"Y" documento de particular relevancia; no se puede considerar que la invención involucre una etapa inventiva cuando el documento es combinado con uno o más de tales documentos, tal combinación sería obvia para una persona experimentada en la técnica.

"&" documento miembro de la misma familia de patentes.

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional
14 de octubre de 2003

Fecha de envío del reporte de búsqueda internacional
03/11/2003

Nombre y dirección de correspondencia de la ISA
Comisionado de Patentes y Marcas Registradas
Oficina Europea de Patentes, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL -2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax; (+31-70) 340-3016

Funcionario Autorizado

Vix, O

99

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/GB03/02942

C (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 00 71153 A (BIO PROD & BIO ENG AG; EIBL JOHANN (AT)) 30 de noviembre de 2000 (2000-11-30) ver también la página 10 y 14 reivindicaciones 1, 27	9-13
Y	EP 0 565 511 A (IMMUNO AG) 13 de octubre de 1993 (1993-10-13) ver la página 2 líneas 14-47, página 3 líneas 5-44	1-7
A	GOLDSACK, NEIL ET AL: "Molecules in focus thrombin" INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, vol. 30, no. 6, junio de 1998 (1998-06), páginas 641-646, XP002257653 ISSN: 1357-2725 el documento completo	9-13

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/GB03/02942

Documento de patente citada en el Reporte de Búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patente(s)	Fecha de publicación
EP 0543178	A 26-05-1993	DE 4137996 A1 AT 162218 T AU 658230 B2 AU 2850292 A CA 2083243 A1 DE 59209133 D1 DK 543178 T3 EP 0543178 A2 ES 2113910 T3 GR 3026253 T3 JP 5194261 A KR 261360 B1 NO 924453 A US 5723123 A	27-05-1993 15-01-1998 06-04-1995 20-05-1993 20-05-1993 19-02-1998 14-09-1998 26-05-1993 16-06-1998 29-05-1998 03-08-1993 01-07-2000 20-05-1993 03-03-1998
EP 0439156	A 31-07-1991	IE 900266 A1 AT 140026 T CA 2034826 A1 DE 69120550 D1 EP 0439156 A1 JP 3276964 B2 JP 4211372 A US 5151355 A ZA 9100500 A	31-07-1991 15-07-1996 25-07-1991 08-08-1996 31-07-1991 22-04-2002 03-08-1992 29-09-1992 27-11-1991
EP 1136084	A 26-09-2001	DE 10012732 A1 AU 2804201 A CA 2340863 A1 EP 1136084 A1 JP 2001261574 A US 2001033837 A1	20-09-2001 20-09-2001 18-09-2001 26-09-2001 26-09-2001 25-10-2001
WO 0071163	A 30-11-2000	WO 0071163 A2 AU 5198600 A CA 2372929 A1 EP 1183043 A2 EP 1278397 A2 HU 0200856 A2 JP 2003500364 T NO 20015510 A SK 16332001 A3 US 2002114796 A1	30-11-2000 12-12-2000 30-11-2000 06-03-2002 15-01-2003 29-07-2002 07-01-2003 12-11-2001 09-05-2002 22-08-2002
EP 0565511	A 13-10-1993	AT 397390 B AT 71292 A AT 181368 T AU 3562393 A CA 2092776 A1 CZ 9300538 A3 DE 59309646 D1 DK 565511 T3 EP 0565511 A1 ES 2134834 T3 FI 931553 A HU 69604 A2 JP 2832129 B2 JP 6098791 A NO 931224 A	25-03-1994 15-08-1993 15-07-1999 07-10-1993 07-10-1993 19-01-1994 22-07-1999 06-12-1999 13-10-1993 16-10-1999 07-10-1993 28-09-1995 02-12-1998 12-04-1994 07-10-1993

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/GB03/02942

Documento de patente citada en el Reporte de Búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patente(s)	Fecha de publicación
EP 0565511	A	PL 298390 A1	18-10-1993
		SK 30993 A3	10-11-1993
		US 5432062 A	11-07-1996
		US 5792623 A	11-08-1998

PATENT COOPERATION TREATY

AS: 96.232
102 1

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

FRANK, B., Dehn & Co.
179 Queen Victoria Street
London EC4V 4EL
GRANDE BRETAGNE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT (PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year) 27.07.2004

Applicant's or agent's file reference
61.78607/001

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/GB 03/02942

International filing date (day/month/year)
07.07.2003

Priority date (day/month/year)
10.07.2002

Applicant
NATIONAL BLOOD AUTHORITY et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2369 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2369 - 4465

Authorized Officer

Guerin, A

Tel. +49 89 2369-3061



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(PCT Article 36 and Rule 70)B
104

Applicant's or agent's file reference 61.78607/001		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/PEA416)	
International application No. PCT/GB 03/02942	International filing date (day/month/year) 07.07.2003	Priority date (day/month/year) 10.07.2002	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC C12N9/74			
Applicant NATIONAL BLOOD AUTHORITY et al.			
1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet. ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of sheets.			
3. This report contains indications relating to the following items: I ☒ Basis of the opinion II ☐ Priority III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV ☐ Lack of unity of invention V ☒ Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI ☐ Certain documents cited VII ☐ Certain defects in the international application VIII ☐ Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 28.01.2004		Date of completion of this report 27.07.2004	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 23699 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 23699 - 4465		Authorized Officer Vix, O Telephone No. +49 89 23699-7326 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. **PCT/GB 03/02942**

by
1/2

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17):*

Description, Pages

1-32 as originally filed

Claims, Numbers

1-13 as originally filed

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
☐ the claims, Nos.:
☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)).

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

105
126

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/GB 03/02942

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement :**

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-8
	No: Claims	9-13
Inventive step (IS)	Yes: Claims	1-8
	No: Claims	9-13
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-13
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

106
[Signature]

Re Item V

**Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or
Industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

The following documents (D) are referred to in this communication; the numbering will
be adhered to in the rest of the procedure:

- D1: EP-A-0 543 178 (BEHRINGWERKE AG) 26 May 1993 (1993-05-26)
- D2: EP-A-0 439 156 (WARNER LAMBERT POTTERY ROAD LI) 31 July 1991
- D3: EP-A-1 136 084 (AVENTIS BEHRING GMBH) 26 September 2001
- D4: WO 00/71153 A (BIO PROD & BIO ENG AG ;EIBL JOHANN (AT)) 30
November 2000 (2000-11-30)
- D5: EP-A-0 565 511 (IMMUNO AG) 13 October 1993 (1993-10-13)
- D6: GOLDSACK NEIL ET AL: "Molecules in focus thrombin" International. J. of
Biochem and Cell Biol., vol. 30, no. 6, June 1998, pgs 641-646

Additional document:

D7: EP1161958

1. Novelty (Art. 33(2) PCT)

- 1.1 The application relates to a method for the preparation of virus-inactivated
thrombin comprising solvent-detergent virus inactivation of a solution comprising
prothrombin and factor X, loading the virus inactivated prothrombin and factor X
onto an anion exchange medium, washing the medium to remove the reagents
used for the solvent-detergent virus inactivation, and activating the prothrombin on
the medium to form thrombin by the addition of metal ions, preferably calcium
ions. The thrombin is then preferably selectively eluted from the anion exchange
medium.**

None of the available prior art specifically discloses this combination of steps in a
method for producing a virus-inactivated thrombin. Thus, in view of the available
prior art, the claimed subject-matter 1-8 appears to be new. Consequently, claims
1-8 do meet the requirements of Article 33(2) PCT.

- 1.2 The applicant's attention is drawn to the fact that product by process claims as
defined in claims 9-11 and 12-13 will not be admissible in the European regional
phase. Such claims are admissible only if the product (thrombin in the present
case) by itself fulfil the requirements for patentability and there is no other**

p7 2

information available in the application which could enable the applicant to define the product satisfactorily by reference to its composition, structure or some other testable parameter. Thrombin is a well known and studied protein which can be prepared using various methods as disclosed in the prior art D1-D4. The applicant's attention is drawn to the fact that a product is not rendered novel merely by the fact that it is purified by means of a new process.

At present, all applications such as D1-D4 disclosing thrombin (and its obtention/preparation) or pharmaceutical composition/kit comprising thrombin are prejudicial for the novelty and inventivity of claims 9-13 under Art 33(2)/(3) PCT.

2. Inventive step (Art. 33(3) PCT)

The application relates to a method for the preparation of virus-inactivated thrombin comprising solvent-detergent virus inactivation of a solution comprising prothrombin and factor X.

The available prior art D1-D3 relate to the preparation of thrombin free of viral contaminant based on various method/process.

D1 relates to a purified thrombin preparation free from viral contamination. The method comprises treating a solution of prothrombin complex, which has been purified on an ion exchanger and subjected to virus inactivation, with a soluble salt containing an anion.

Another example is D2 which discloses a process for the production of a liquid thrombin preparation which comprises reacting each unit of prothrombin with less than 50% of the conventional thromboplastin input in the presence of calcium, contacting the resultant thrombin with a phosphate buffer, and diluting and filtering the suspension. The filtrate is then applied sequentially to an anion-exchange agarose column and a cation-exchange agarose column and the thrombin fraction is step-wise eluted from the latter column with phosphate buffered saline.

Based on the teaching of the prior art such as D1, the technical problem to be solved could be seen as the provision of an alternative method for producing a virus inactivated thrombin preparation.

As seen from D1 or D3, protein preparation can be treated using different virus inactivation processes. Other methods are known to the skilled person in the art

100
100

such as solvent-detergent virus inactivation steps. For example, D7 discloses a method for inactivating viruses in biological liquid solution which comprises contacting the biological liquid solution with solvent detergent mixture. The solvent detergent mixture at a predetermined concentration and conditions is able to inactivate lipid-coated viruses. The solvent-detergent mixture is removed by passing the liquid solution on a chromatographic packing.

Thus, in the light of D1 and D7, the present subject-matter of claims 1-8 could be seen as the combination of a known solvent-detergent technique and anion-exchange chromatography purification steps applied to thrombin. However, D1 does not suggest that activation of prothrombin complex to form thrombin could occur while bound to an anion exchange medium, nor does it suggest to combine this technique with a solvent-detergent virus inactivation treatment.

As the claimed method allows the efficient preparation of virus-safe thrombin without any addition of thrombin or thromboplastin for activation (like in D1 or D2), using solvent-detergent treated prothrombin bound to an anion exchange medium and use of metal ions to activate the prothrombin to form thrombin, said method is considered to achieve a surprising technical effect over the available prior art. Thus, the presence of an inventive step within the subject-matter of claims 1-8 is acknowledged. Consequently, said claims do meet the requirements of Article 33(3) PCT.

TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES

PCT

REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(Artículo 36 y Regla 70 del PCT)

Referencia de archivo del solicitante o apoderado: 61.78607/001	PARA UNA ACCION Véase la Notificación de transmisión del reporte ADICIONAL de examen preliminar internacional (Forma PCT/IPEA/416)	
No. de solicitud internacional: PCT/GB 03/02942	Fecha de presentación internacional (día/mes/año): 07.07.2003	Fecha de prioridad (día/mes/año): 10.07.2002
Clasificación de Patente Internacional (IPC) o clasificación nacional e IPC: C12N9/74		
Solicitante: NATIONAL BLOOD AUTHORITY et al.		

1. Este reporte de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de acuerdo al Artículo 36.	
2. Este REPORTE consiste de un total de <u>6</u> hojas que incluyen esta portada.	
☐ Este reporte también está acompañado de ANEXOS, esto es, hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos los cuales han sido enmendados y son la base de este reporte y/u hojas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad. (véase Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas bajo el PCT). Estos anexos consisten de un total de _____ Hojas.	
3. Este reporte contiene indicaciones y páginas correspondientes que se relacionan con los siguientes puntos: I ☒ Base del reporte II ☐ Prioridad III ☐ No se establece opinión con respecto a novedad, paso o etapa inventiva y aplicabilidad industrial IV ☐ Falta de unidad de la invención V ☒ Declaración justificada conforme a la Regla 66.2(a)(ii) con respecto a novedad, etapa o paso inventivo o aplicabilidad Industrial; citas y explicaciones que apoyan tal declaración. VI ☐ Ciertos documentos citados VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional VIII ☐ Ciertas observaciones en la solicitud internacional	
Fecha de presentación de la solicitud: 28.01.2004	Fecha de complemento de este reporte: 27.07.2004
Nombre y dirección de correspondencia de la autoridad del examen preliminar internacional: European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399-4465	Funcionario autorizado Vix, O Teléfono No.: +49 89 2399 7326

Forma PCT/IPEA/409 (hoja de portada) (enero del 2004)

REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL	No. de solicitud internacional PCT/GB 03/02942
---	---

I. Base del reporte

1. Por lo que se refiere a los elementos de la solicitud internacional (las hojas de reemplazo que han sido remitidas en la oficina receptora en respuesta a una invitación hecha conforme al artículo 14 son consideradas en la presente relación como "depositadas inicialmente" y no son adjuntadas en el anexo al reporte porque las mismas no contienen modificaciones (reglas 70.16 y 70.17)):

Descripción, páginas:

1-32 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, N°:

1-13 como se presentaron originalmente

2. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional se llevó a cabo con base en la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó la misma, a menos que se indique de otra manera bajo este punto.

Estos elementos estuvieron disponibles o fueron provistos a esta autoridad en el siguiente lenguaje: , el cual es

☐ el lenguaje de una traducción provista para los propósitos de la búsqueda internacional (bajo la Regla 23.1 (b)).

☐ el lenguaje de publicación de la solicitud internacional (bajo la Regla 48.3 (b)).

☐ el lenguaje de una traducción provista para los propósitos del examen preliminar internacional (bajo la Regla 56.2 y/o 55.3).

3. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos descrita en la solicitud internacional, la búsqueda interna se llevó a cabo con base en el listado de secuencias:

☐ Contenida en la solicitud internacional en la forma escrita

☐ Presentada junto con la solicitud internacional en una forma descifrable por computadora

☐ Provista subsiguientemente a esta Autoridad en la forma escrita

☐ Provista subsiguientemente a esta Autoridad en forma descifrable por computadora

☐ El fundamento que el listado de secuencia está provista subsiguientemente no va más allá de la descripción en la solicitud internacional como se presentó

☐ El fundamento de que la información registrada en la forma descifrable por computadora es idéntica al listado de secuencias ha sido provisto.

4. Las enmiendas han conducido a la cancelación de:

☐ la descripción, páginas:

☐ las reivindicaciones, Nos. :

☐ los dibujos, hojas:

5. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (alguna de) las enmiendas no se hubiera hecho, puesto que las mismas se ha considerado que van más allá de la descripción como se presentó (Regla 70.2(c)):

(Cualquier hoja de reemplazo que contenga tales enmiendas debe ser referida bajo el punto 1 y anexada a este reporte)

6. Observaciones adicionales, si es necesario:

REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional

PCT/GB 03/02942

V. Declaración justificada bajo el artículo 35(2) con respecto a la novedad, etapa inventiva o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que apoyan tal declaración.

1. DECLARACION

Novedad (N)	Si:	Reivindicaciones	1-8
	No:	Reivindicaciones	9-13
Etapa Inventiva (IS)	Si:	Reivindicaciones	1-8
	No:	Reivindicaciones	9-13
Campo de aplicación industrial (IA)	Si:	Reivindicaciones	1-13
	No:	Reivindicaciones	

2. Citas y explicaciones

véase la hoja separada

Re Punto V

Declaración razonada bajo la Regla 66.2(a)(ii) con respecto a novedad, paso inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que soportan tal declaración

Los siguientes documentos (D) se refieren en este comunicado; la numeración será adherida al resto del procedimiento.

D1: EP-A-0 543 178 (BEHRINGWERKE AG) 26 de mayo de 1993 (1993-05-26)

D2: EP-A-0 439 158 (WARNER LAMBERT POTTERY ROAD LI) 31 de julio de 1991 (1991-07-31)

D3: EP-A-1 136 084 (AVENTIS BEHRING GMBH) 26 de septiembre de 2001

D4: WO 00/71153 A (BIO PROD & BIO ENG AG; EIBL JOHANN (AT)) 30 de noviembre de 2000 (2000-11-30)

D5: EP-A-0 565 511 (IMMUNO AG) 13 de octubre de 1993 (1993-10-13)

D6: GOLDSACK NEIL ET AL: "Molecules in focus thrombin"

INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, vol. 30,
no. 6, junio de 1998 (1998-06), páginas 641-646

Documento adicional:

D7: EP1161958

1. Novedad (Art. 33(2) del PCT)

1.1 La solicitud se refiere a un método para la preparación de trombina con virus inactivados que comprende inactivación de virus de solvente-detergente de una solución que comprende protrombina y el factor X cargar la protrombina con virus inactivados y el factor X sobre un medio de intercambio aniónico, lavar el medio para remover los reactivos usados para la inactivación del virus con solvente-detergente y activar la protrombina sobre el medio para formar la trombina mediante la adición de iones metálicos, de preferencia iones de calcio. La trombina después se eluye de preferencia selectivamente del medio de intercambio aniónico.

Nada del arte previo disponible describe específicamente esta combinación de etapas en un método para producir una trombina con virus inactivados. Así, desde el punto de vista del arte previo disponible, el asunto relacionado reivindicado 1-8 parece que es nuevo. En consecuencia, las reivindicaciones 1-8 satisfacen los requerimientos del Artículo 33(2) del PCT.

1.2 La atención del solicitante se enfoca en el hecho de que el producto mediante las reivindicaciones de proceso como se define en las reivindicaciones 9-11 y 12-13, no será admisible en la fase

regional Europea. Tales reivindicaciones son admisibles sólo si el producto (trombina en el presente caso) por sí misma satisface los requerimientos de patentabilidad y no existe otra información disponible en la solicitud que pueda permitir que el solicitante defina el producto satisfactoriamente con referencia a su composición, estructura o algunos otros parámetros que se pueden probar. La trombina es una proteína bien conocida y estudiada, que puede prepararse usando diferentes métodos como se describe en el arte previo D1-D4. La atención del solicitante se enfoca en el hecho de que un producto no se hace nuevo exclusivamente por el hecho de que se purifica por medio de un nuevo proceso.

En el presente, todas las solicitudes, tales como D1-D4 que describen la trombina (y su obtención/preparación) o composición farmacéutica/kit que comprende trombina son perjudiciales para la novedad de las reivindicaciones 9-13 bajo el Artículo 33(3) del PCT.

2. Paso Inventivo (Art. 33(3) del PCT).

La solicitud se refiere a un método para la preparación de trombina con virus inactivados que comprende inactivación de virus con solvente-detergente de una solución que comprende protrombina y factor X.

El arte previo disponible D1-D3 se refiere a la preparación de trombina libre de contaminación viral basada en diferentes métodos/procesos.

D1 se refiere a una preparación de trombina purificada libre de contaminación viral. El método comprende tratar una solución del complejo protrombina, que se ha purificado en un intercambiador iónico y sometido a inactivación de virus, con una sal soluble que contiene un anión.

Otro ejemplo es D2 que describe un proceso para la producción de una preparación de trombina líquida que comprende hacer reaccionar cada unidad de protrombina con menos de 50% de la entrada tromboplastina convencional en presencia de calcio, poner en contacto la trombina resultante con un amortiguador de fosfato y diluir y filtrar la suspensión. El filtrado después se aplica secuencialmente a una columna de agarosa de intercambio aniónico y a una columna de agarosa de intercambio catiónico y la fracción de trombina se eluye etapa por etapa desde la última columna con la solución salina amortiguada con fosfato.

Con base en la enseñanza del arte previo, tal como D1 o D2, el problema técnico que se resolverá puede observarse como el suministro de un método alternativo para producir una preparación de trombina con virus inactivados.

Como se observa de D1 o D3, la preparación proteínica puede tratarse usando diferentes procesos de inactivación de virus. Son conocidos otros métodos para los experimentados en el arte, tales como etapas de inactivación de virus por solvente-detergente.

Por ejemplo, D7 describe un método para inactivar virus en una solución biológica líquida que comprende poner en contacto la solución biológica líquida con una mezcla de solvente y detergente. La mezcla de solvente y detergente a una concentración y condiciones predeterminadas es capaz de inactivar los virus recubiertos con lípidos. La mezcla de solvente-detergente se remueve pasando la solución líquida sobre un empaque cromatográfico.

De esta manera, desde el punto de vista de (por ejemplo) D1 y D7, la persona experimentada tendría razones íntegras para esperar que la combinación de solvente-detergente y etapas de purificación por cromatografía de intercambio aniónico produciría resultados similares a los del método reivindicado. En consecuencia, en ausencia de un efecto técnico sorprendente, el asunto relacionado de las reivindicaciones 1-13 es exclusivamente una combinación obvia de las características conocidas y no se considera que requiera un paso inventivo. El asunto relacionado que no se ha anticipado directamente por D1 y D7 no parece que involucre ninguna enseñanza técnica que pueda considerarse como inventiva, desde el punto de vista del conocimiento rutinario de un experimentado en el arte.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

FRANK, B., Dehn & Co.
179 Queen Victoria Street
London EC4V 4EL
GRANDE BRETAGNE

File 61.72607/001

- 1 APR 2004

Frank B. Dehn & Co.
RECEIVED

AMSD

PCT

WRITTEN OPINION
(PCT Rule 66)

116
DUE DATES
NOTED

30/6/04

Date of mailing
(day/month/year)

30.03.2004

Applicant's or agent's file reference

REPLY DUE

within 3 month(s)
from the above date of mailing

International application No.
PCT/GB 03/02942

International filing date (day/month/year)
07.07.2003

Priority date (day/month/year)
10.07.2002

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C12N9/74, C12N9/74

Applicant
NATIONAL BLOOD AUTHORITY et al.

1. This written opinion is the first drawn up by this International Preliminary Examining Authority.
2. This opinion contains indications relating to the following items:
 - I ☒ Basis of the opinion
 - II ☐ Priority
 - III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - IV ☐ Lack of unity of invention
 - V ☒ Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
 - VI ☐ Certain documents cited
 - VII ☐ Certain defects in the international application
 - VIII ☐ Certain observations on the international application

3. The applicant is hereby invited to reply to this opinion.

When? See the time limit indicated above. The applicant may, before the expiration of that time limit, request this Authority to grant an extension, see Rule 66.2(d).

How? By submitting a written reply, accompanied, where appropriate, by amendments, according to Rule 66.3. For the form and the language of the amendments, see Rules 66.8 and 66.9.

Also: For an additional opportunity to submit amendments, see Rule 66.4. For the examiner's obligation to consider amendments and/or arguments, see Rule 66.4 bis. For an informal communication with the examiner, see Rule 66.6.

If no reply is filed, the international preliminary examination report will be established on the basis of this opinion.

4. The final date by which the international preliminary examination report must be established according to Rule 69.2 is:

Last of 2nd mos expd = 10-11-04
6 mos from Demand = July '04

Name and mailing address of the international preliminary examining authority:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 apmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Formalities officer (incl. extension of time limits)
Guerin, A
Telephone No. +49 89 2399-8061



119

[Handwritten signature]

I. Basis of the opinion

1. With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this opinion as "originally filed"*):

Description, Pages

1-32 as originally filed

Claims, Numbers

1-13 as originally filed

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:
- ☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This opinion has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)).

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

118
2/4

WRITTEN OPINION

International application No. **PCT/GB 03/02942**

Novelty (N)	Claims	9-13
Inventive step (IS)	Claims	1-13
Industrial applicability (IA)	Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

119 

Re Item V

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

The following documents (D) are referred to in this communication; the numbering will be adhered to in the rest of the procedure:

- D1: EP-A-0 543 178 (BEHRINGWERKE AG) 26 May 1993 (1993-05-26)
- D2: EP-A-0 439 156 (WARNER LAMBERT POTTERY ROAD LI) 31 July 1991
- D3: EP-A-1 136 084 (AVENTIS BEHRING GMBH) 26 September 2001
- D4: WO 00/71153 A (BIO PROD & BIO ENG AG ;EIBL JOHANN (AT)) 30 November 2000 (2000-11-30)
- D5: EP-A-0 565 511 (IMMUNO AG) 13 October 1993 (1993-10-13)
- D6: GOLDSACK NEIL ET AL: "Molecules in focus thrombin" INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, vol. 30, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 641-646

Additional document:

D7: EP1161958

Re Item V

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Novelty (Art. 33(2) PCT)

The application relates to a method for the preparation of virus-inactivated thrombin comprising solvent-detergent virus inactivation of a solution comprising prothrombin and factor X, loading the virus inactivated prothrombin and factor X onto an anion exchange medium, washing the medium to remove the reagents used for the solvent-detergent virus inactivation, and activating the prothrombin on the medium to form thrombin by the addition of metal ions, preferably calcium ions. The thrombin is then preferably selectively eluted from the anion exchange medium.

1.1 The applicant's attention is drawn to the fact that product by process claims as

120
X
X

defined in claims 9-11 and 12-13 will not be admissible in the European regional phase. Such claims are admissible only if the product (thrombin in the present case) by itself fulfil the requirements for patentability and there is no other information available in the application which could enable the applicant to define the product satisfactorily by reference to its composition, structure or some other testable parameter. Thrombin is a well known and studied protein which can be prepared using various methods as disclosed in the prior art D1-D4. The applicant's attention is drawn to the fact that a product is not rendered novel merely by the fact that it is purified by means of a new process.

At present, all applications such as D1-D4 disclosing thrombin (and its obtention/preparation) or pharmaceutical composition/kit comprising thrombin are prejudicial for the novelty of claims 9-13 under Art 33(3) PCT.

2. Inventive step (Art. 33(3) PCT)

The application relates to a method for the preparation of virus-inactivated thrombin comprising solvent-detergent virus inactivation of a solution comprising prothrombin and factor X.

The available prior art D1-D3 relate to the preparation of thrombin free of viral contaminant based on various method/process.

D1 relates to a purified thrombin preparation free from viral contamination. The method comprises treating a solution of prothrombin complex, which has been purified on an ion exchanger and subjected to virus inactivation, with a soluble salt containing an anion.

Another example is D2 which discloses a process for the production of a liquid thrombin preparation which comprises reacting each unit of prothrombin with less than 50% of the conventional thromboplastin input in the presence of calcium, contacting the resultant thrombin with a phosphate buffer, and diluting and filtering the suspension. The filtrate is then applied sequentially to an anion-exchange agarose column and a cation-exchange agarose column and the thrombin fraction is step-wise eluted from the latter column with phosphate buffered saline.

Based on the teaching of the prior art such as D1 or D2, the technical problem to be solved could be seen as the provision of an alternative method for producing a virus inactivated thrombin preparation.

12/27

As seen from D1-D4, protein preparation can be treated using different virus inactivation processes. Other methods are known to the skilled person in the art such as solvent-detergent virus inactivation steps. For example, D7 discloses a method for inactivating viruses in biological liquid solution which comprises contacting the biological liquid solution with solvent detergent mixture. The solvent detergent mixture at a predetermined concentration and conditions is able to inactivate lipid-coated viruses. The solvent-detergent mixture is removed by passing the liquid solution on a chromatographic packing.

Thus, in the light of (for example) D1 and D7, the person of skill would have sound reasons to expect that the combination of solvent-detergent and anion-exchange chromatography purification steps would produce similar results as the claimed method. Consequently, in absence of a surprising technical effect, the subject-matter of claims 1-13 is merely an obvious combination of known features and is not considered to require an inventive step. The subject-matter which is not directly been anticipated by D1 and D7 does not appear to involve any technical teaching which can be considered as inventive in view of the routine knowledge of a person skilled in the art.

TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES

122
123

De la
AUTORIDAD DEL EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Para:
FRANK, B., Dehn & Co.
179 Queen Victoria Street
London EC4V 4EL
GRAN BRETAÑA

PCT

OPINION ESCRITA
(Regla 66 del PCT)

Fecha de envío 30.03.2004
(día/mes/año):

Referencia de archivo del solicitante o apoderado:

VENCIMIENTO DE dentro de 3 meses a partir
CONTESTACION de la fecha de envío anterior.

No. de solicitud internacional:
PCT/GB 03/02942

Fecha de presentación internacional
(día/mes/año): 07.07.2003

Fecha de prioridad (día/mes/año):
10.07.2002

Clasificación de Patente Internacional (IPC) o clasificación nacional e IPC:
C12 N9/74, C12N9/74

Solicitante
NATIONAL BLOOD AUTHORITY et al.

1. Esta opinión escrita es la primera (primera, etc.) redactada por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional.

2. Este reporte contiene indicaciones y páginas correspondientes que se relacionan con los siguientes puntos:

I ☒ Base de la opinión

II ☐ Prioridad

III ☒ No se establece opinión con respecto a novedad, paso o etapa inventiva y aplicabilidad industrial

IV ☐ Falta de unidad de la invención

V ☒ Declaración justificada bajo la Regla 66.2(a)(ii) con respecto a novedad, etapa o paso inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que apoyan tal declaración.

VI ☐ Ciertos documentos citados

VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional

VIII ☐ Ciertas observaciones en la solicitud internacional

3. Mediante la presente el solicitante está invitado a responder a esta opinión

¿Cuándo? Véase el límite de tiempo indicado anteriormente. El solicitante puede, antes de la expiración de aquel límite de tiempo, solicitar a esta Autoridad que conceda una extensión, véase Regla 66.2(d).

¿Cómo? Al presentar una respuesta por escrito, acompañada, en donde sea apropiado, por enmiendas, de acuerdo a la Regla 66.3. Para la forma y la lengua de las enmiendas, véanse Reglas 66.8 y 66.9.

También Para una oportunidad adicional para presentar estas enmiendas, véase la Regla 66.4

Para la obligación del examinador a considerar las enmiendas y/o argumentos, véase la Regla 66.4bis.

Para una comunicación informal con el examinador, véase la Regla 66.6.

Si no se presenta respuesta, el reporte de examen preliminar internacional será establecido en base a esta opinión.

4. La fecha final en la cual el reporte de examen preliminar internacional debe ser establecido

De acuerdo a la Regla 69.2 es:

Nombre y dirección de correspondencia de la autoridad
del examen preliminar internacional:
European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399-0, Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399-4465

Funcionario Autorizado

Funcionario de formalidades (incluyendo extensión de límite de
tiempo)

Guerin, A

No. telefónico: +49 89 2399-8061

Forma PCT/IPEA/408 (portada) (enero del 2004)

OPINIÓN ESCRITA		No. de solicitud internacional PCT/GB 03/02942
I. Base de la opinión		
1. Con respecto a los elementos de la solicitud internacional (Las hojas de reemplazo que han sido provistas a la Oficina Receptora en respuesta a una invitación bajo el Artículo 14 son referidas en esta opinión como "presentadas originalmente"):		
Descripción, páginas:		
1-32	como se presentaron originalmente	
Reivindicaciones, No.:		
1-13	como se presentaron originalmente	
2. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional se llevó a cabo con base en la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó la misma, a menos que se indique de otra manera bajo este punto.		
Estos elementos estuvieron disponibles o fueron provistos a esta autoridad en el siguiente lenguaje: , el cual es		
☐ el lenguaje de una traducción provista para los propósitos de la búsqueda internacional (bajo la Regla 23.1 (b)).		
☐ el lenguaje de publicación de la solicitud internacional (bajo la Regla 48.3 (b)).		
☐ el lenguaje de una traducción provista para los propósitos del examen preliminar internacional (bajo la Regla 56.2 y/o 55.3).		
3. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos descrita en la solicitud internacional, la búsqueda interna se llevó a cabo con base en el listado de secuencias:		
☐ Contenida en la solicitud internacional en la forma escrita		
☐ Presentada junto con la solicitud internacional en una forma descifrable por computadora		
☐ Provista subsiguientemente a esta Autoridad en la forma escrita		
☐ Provista subsiguientemente a esta Autoridad en forma descifrable por computadora		
☐ La declaración de que el listado de secuencia está provista subsiguientemente no va más allá de la descripción en la solicitud internacional como se presentó		
☐ La declaración de que la información registrada en la forma descifrable por computadora es idéntica al listado de secuencias ha sido provisto.		
4. Las enmiendas han dado como resultado la cancelación de:		
☐	La descripción, páginas	_____
☐	las reivindicaciones, Nos.	_____
☐	los dibujos, hojas/figuras	_____
5. ☐ Esta opinión ha sido establecida como si (algunas de) las enmiendas no se hubieran hecho, puesto que se ha considerado que van más allá de la descripción como se presentó, como se indica en el bloque complementario (Regla 70.2(c)).		
6. Observaciones adicionales, si es necesario:		

124

OPINIÓN ESCRITA		No. de solicitud internacional PCT/GB 03/02942
V. Declaración justificada bajo la Regla 66.2(a)(ii) con respecto a la novedad, etapa inventiva o aplicabilidad industrial: citas y explicaciones que apoyan tal declaración.		
1. DECLARACION		
Novedad (N)	Reivindicaciones	9-13
Etapa Inventiva (IS)	Reivindicaciones	1-13
Aplicabilidad industrial (IA)	Reivindicaciones	
2. CITAS Y EXPLICACIONES		
véase la hoja separada		
<u>Re Punto V</u> Declaración razonada bajo la Regla 66.2(a)(ii) con respecto a novedad, paso inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que soportan tal declaración Los siguientes documentos (D) se refieren en este comunicado; la numeración será adherida al resto del procedimiento. D1: EP-A-0 543 178 (BEHRINGWERKE AG) 26 de mayo de 1993 (1993-05-26) D2: EP-A-0 439 158 (WARNER LAMBERT POTTERY ROAD LI) 31 de julio de 1991 (1991-07-31) D3: EP-A-1 136 084 (AVENTIS BEHRING GMBH) 26 de septiembre de 2001 D4: WO 00/71153 A (BIO PROD & BIO ENG AG; EIBL JOHANN (AT)) 30 de noviembre de 2000 (2000-11-30) D5: EP-A-0 565 511 (IMMUNO AG) 13 de octubre de 1993 (1993-10-13) D6: GOLDSACK NEIL ET AL: "Molecules in focus thrombin" INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, vol. 30, no. 6, junio de 1998 (1998-06), páginas 641-646		

Documento adicional:

D7: EP1161958

Re Punto V

Declaración razonada bajo la Regla 66.2(a)(ii) con respecto a novedad, paso inventivo o aplicabilidad industrial, citas y explicaciones que soportan tal declaración

1. Novedad (Art. 33(2) del PCT)

La solicitud se refiere a un método para la preparación de trombina con virus inactivados que comprende inactivación de virus de solvente-detergente de una solución que comprende protrombina y el factor X cargar la protrombina con virus inactivados y el factor X sobre un medio de intercambio aniónico, lavar el medio para remover los reactivos usados para la inactivación del virus con solvente-detergente y activar la protrombina sobre el medio para formar la trombina mediante la adición de iones metálicos, de preferencia iones de calcio. La trombina después se eluye de preferencia selectivamente del medio de intercambio aniónico.

1.1 La atención del solicitante se enfoca en el hecho de que el producto mediante las reivindicaciones de proceso como se define en las reivindicaciones 9-11 y 12-13, no será admisible en la fase regional Europea. Tales reivindicaciones son admisibles sólo si el producto (trombina en el presente caso) por si misma satisface los

requerimientos de patentabilidad y no existe otra información disponible en la solicitud que pueda permitir que el solicitante defina el producto satisfactoriamente con referencia a su composición, estructura o algunos otros parámetros que se pueden probar. La trombina es una proteína bien conocida y estudiada, que puede prepararse usando diferentes métodos como se describe en el arte previo D1-D4. La atención del solicitante se enfoca en el hecho de que un producto no se hace nuevo exclusivamente por el hecho de que se purifica por medio de un nuevo proceso.

En el presente, todas las solicitudes, tales como D1-D4 que describen la trombina (y su obtención/preparación) o composición farmacéutica/kit que comprende trombina son perjudiciales para la novedad de las reivindicaciones 9-13 bajo el Artículo 33(3) del PCT.

2. Paso Inventivo (Art. 33(3) del PCT).

La solicitud se refiere a un método para la preparación de trombina con virus inactivados que comprende inactivación de virus con solvente-detergente de una solución que comprende protrombina y factor X.

El arte previo disponible D1-D3 se refiere a la preparación de trombina libre de contaminación viral basada en diferentes métodos/procesos.

D1 se refiere a una preparación de trombina purificada libre de contaminación viral. El método comprende tratar una solución del

complejo protrombina, que se ha purificado en un intercambiador iónico y sometido a inactivación de virus, con una sal soluble que contiene un anión.

Otro ejemplo es D2 que describe un proceso para la producción de una preparación de trombina líquida que comprende hacer reaccionar cada unidad de protrombina con menos de 50% de la entrada tromboplastina convencional en presencia de calcio, poner en contacto la trombina resultante con un amortiguador de fosfato y diluir y filtrar la suspensión. El filtrado después se aplica secuencialmente a una columna de agarosa de intercambio aniónico y a una columna de agarosa de intercambio catiónico y la fracción de trombina se eluye etapa por etapa desde la última columna con la solución salina amortiguada con fosfato.

Con base en la enseñanza del arte previo, tal como D1 o D2, el problema técnico que se resolverá puede observarse como el suministro de un método alternativo para producir una preparación de trombina con virus inactivados.

Como se observa de D1-D4, la preparación proteínica puede tratarse usando diferentes procesos de inactivación de virus. Son conocidos otros métodos para los experimentados en el arte, tales como etapas de inactivación de virus por solvente-detergente. Por ejemplo, D7 describe un método para inactivar virus en una solución biológica líquida que comprende poner en contacto la solución biológica líquida con una mezcla de solvente y

128
detergente. La mezcla de solvente y detergente a una concentración y condiciones predeterminadas es capaz de inactivar los virus recubiertos con lípidos. La mezcla de solvente-detergente se remueve pasando la solución líquida sobre un empaque cromatográfico.

De esta manera, desde el punto de vista de (por ejemplo) D1 y D7, la persona experimentada tendría razones íntegras para esperar que la combinación de solvente-detergente y etapas de purificación por cromatografía de intercambio aniónico produciría resultados similares a los del método reivindicado. En consecuencia, en ausencia de un efecto técnico sorprendente, el asunto relacionado de las reivindicaciones 1-13 es exclusivamente una combinación obvia de las características conocidas y no se considera que requiera un paso inventivo. El asunto relacionado que no se ha anticipado directamente por D1 y D7 no parece que involucre ninguna enseñanza técnica que pueda considerarse como inventiva, desde el punto de vista del conocimiento rutinario de un experimentado en el arte.

European Patent Office
D-80298 München
Germany

129
130

date 30 June 2004
your ref
our ref 61.78607/001

BY FACSIMILE
Confirmation by Mail

Dear Sirs

International Patent Application No. PCT/GB03/02942 of National Blood Authority et al

I write in reply to the first Written Opinion dated 30 March 2004.

The Written Opinion raised a lack of novelty objection against the product claims (claims 9-13), stating that they would not be admissible in the European Regional phase. The applicants will deal with any objections to these claims during the National/Regional phases of the application.

The Written Opinion raised a lack of inventive step objection against the method claims, claims 1-9. The applicants agree with the Examiner that the technical problem underlying the invention may be seen as the provision of an alternative method for producing a virus inactivated thrombin preparation. However, none of the prior art cited by the Examiner would have led a skilled person to the method of the present invention.

The present method comprises carrying out a solvent-detergent virus inactivation on a solution comprising prothrombin and factor X. The inactivated solution is then loaded onto an anion exchange medium which is washed to remove the reagents used for the solvent-detergent virus inactivation step. The prothrombin is then activated, whilst bound to the medium, by the addition of metal ions to form thrombin. The product thrombin may then be selectively eluted from the anion exchange medium.

As discussed on pages 2-3 of the present application, previous attempts to utilise solvent-detergent treated prothrombin to form thrombin required use of added phospholipids for the activation step. The present invention overcomes this defect in the prior art by carrying out the activation using only metal ions whilst the prothrombin is bound to the anion exchange medium. The present method is therefore a more efficient and convenient way to obtain highly purified virus inactivated thrombin than the prior art methods.

D1 (EP-A 0543178) discloses the activation of prothrombin complex to form thrombin in solution. The prothrombin complex used can be purified first on anion exchanges and then pasteurised to inactivate viruses (see page 2, lines 37-42). The activation is carried out by

130
137

addition of a salt with an anion which complexes calcium. A catalytic quantity of thrombin is also required for the activation step. Nowhere in D1 is there any suggestion that the activation of the prothrombin complex to form thrombin could occur whilst the prothrombin was bound to an anion exchange medium. Furthermore, there is no suggestion in D1 that the virus inactivation could take place by solvent-detergent treatment before binding of the prothrombin to an anion exchange resin.

The method of D1 requires use of thrombin itself for the activation (either endogenous thrombin or added thrombin). This leads to a potentially less-controllable and less-virus safe process than that now claimed, which requires activation only by addition of a metal ion. Furthermore, the pasteurisation described in D1 is a difficult process to control for labile proteins.

D2 (EP-A 0439156) discloses the activation of prothrombin in solution by addition of thromboplastin and calcium, followed by purification of the resultant thrombin by anion and cation exchange chromatography. There is no reference to any virus inactivation processes in D2. Nor is there any suggestion that the activation could take place whilst the prothrombin was bound to an anion exchange medium. Furthermore, the activation process requires thromboplastin which is itself a potential source of viral contamination.

D3 (EP-A 1136084) discloses the activation of prothrombin in solution to form thrombin. It is stated that the prothrombin can be purified on an ion exchanger and then subjected to virus inactivation by, for example, pasteurisation prior to activation to form thrombin. However, there is no suggestion in D3 that the virus inactivation could take place by solvent-detergent treatment of the prothrombin. Furthermore, there is no suggestion that the prothrombin could be activated to form thrombin whilst bound to an anion exchange resin.

D4 (WO 00/71153) simply discloses use of thrombin-fibrinogen kits as medicaments. There is reference to the thrombin being "virus inactivated" but no disclosure of how exactly it is prepared.

D7 (EP-A 1161958) discloses a method for the inactivation of viruses in biological liquids by solvent-detergent treatment. It does not disclose any method for the preparation of thrombin from prothrombin.

None of the prior art would have led a skilled person to the claimed process wherein thrombin is obtained from solvent-detergent treated prothrombin bound to an anion exchange medium. The method of the invention allows efficient preparation of virus-safe thrombin without the need for addition of thrombin or thromboplastin, which are themselves sources of potential viral contamination. The process of the present invention utilises metal ions to activate the prothrombin to form thrombin, allowing preparation of highly pure virus inactivated thrombin in a single step.

In the light of the above, it is hoped that the Examiner can now acknowledge an inventive step for claims 1-8 of the present application. It is therefore hoped that the Examiner can issue an International Preliminary Examination Report indicating an inventive step for at least claims 1-8 of the present application.

30 June 2004
61.78607/001

- 3 -

131
251

Please acknowledge receipt of this letter by returning the EPO form 1037 which accompanies the confirmation copy.

Yours faithfully
Frank B. Dehn & Co.

Annabel R. Beacham

enc.jg

Oficina Europea de patentes

D-80298 München

Alemania

Fecha: 11 de junio de 2004

Su referencia:

Nuestra referencia: 61.78607/001

VÍA FACSIMIL

Confirmación por Correo

Queridos Señores:

Solicitud de Patente Internacional No. PCT/GB03/02942 de
National Blood Authority et al.

Escribo en respuesta a la Opinión Escrita fechada el 30 de
marzo de 2004.

La opinión escrita sugerida carece de objeciones de novedad
contra las reivindicaciones del producto (reivindicaciones 9-13)
que establecen que no serían admisibles en la fase Regional
Europea. Los solicitantes tratarán con cualesquiera objeciones a
estas reivindicaciones durante las fases Nacional/Regional de la
solicitud.

La opinión escrita presentó una carencia de una objeción
del paso inventivo contra las reivindicaciones del método, las
reivindicaciones 1-9. Los solicitantes están de acuerdo con el
Examinador de que el problema técnica que fundamenta a la
invención puede observarse como el suministro de un método
alternativo para producir una preparación de trombina con virus
inactivados. Sin embargo, ninguno de los documentos del arte
previo citado por el Examinador tendría que haber conducido a un
experimentado en el arte al método de la presente invención.

El presente método comprende llevar a cabo una inactivación
del virus por solvente-detergente en una solución que comprende

3

protrombina y el factor X. La solución inactivada después se carga en un medio de intercambio aniónico que se lava para remover los reactivos usados para la etapa de inactivación del virus por solvente-detergente. Después se activa la protrombina, mientras se enlaza al medio, por la adición de iones metálicos para formar la trombina. La trombina del producto después puede eluirse selectivamente del medio de intercambio aniónico.

Como se discute en las páginas 2-3 de la presente solicitud, los intentos anteriores para usar la protrombina tratada con solvente-detergente para formar la trombina, requirieron el uso de fosfolípidos adicionales para la etapa de activación. La presente solicitud supera este defecto en el arte previo llevando a cabo la activación usando sólo iones metálicos, mientras que la protrombina se enlaza al medio de intercambio aniónico. Por lo tanto, el presente método es una manera más eficiente y conveniente de obtener trombina con virus inactivados altamente purificada que los métodos del arte previo.

D1 (EP-A 0543178) describe la activación del complejo de protrombina para formar trombina en solución. El complejo de protrombina usado puede purificarse primero en intercambiadores aniónicos y después pasteurizarse para inactivar los virus (ver página 2, líneas 37-42). La activación se lleva a cabo mediante la adición de una sal con un anión que acompleja el calcio. Una cantidad catalítica de trombina también se requiere para la etapa de activación. En ninguna parte de D1 hay sugerencia de que se pueda presentar la activación del complejo de protrombina para formar trombina, mientras que la protrombina se enlazó a un medio de intercambio aniónico. Además, no hay sugerencia en D1 de que la activación del virus pueda llevarse a cabo por tratamiento con solvente-detergente antes de enlazar la

134
24

protrombina a una resina de intercambio aniónico.

El método de D1 requiere el uso de trombina para la activación (ya sea trombina endógena o trombina adicionada). Esto conduce a un proceso potencialmente menos controlable y menos seguro con respecto a los virus que el ahora reivindicado, lo que requiere únicamente la activación mediante la adición de un ión metálico. Además, la pasteurización descrita en D1 es un proceso difícil de controlar para las proteínas lábiles.

D2 (EP-A 0439156) describe la activación de protrombina en solución mediante la adición de tromboplastina y calcio, seguido de purificación de la trombina resultante mediante cromatografía de intercambio aniónico y catiónico. No existe referencia a ningunos procesos de inactivación de virus en D2. Tampoco hay sugerencia de que la activación pudiera llevarse a cabo mientras se enlazó la protrombina a un medio de intercambio aniónico. Además, el proceso de activación requiere que la tromboplastina sea esta misma una fuente potencial de contaminación viral.

D3 (EP-A 1136084) describe la activación de protrombina en solución para formar trombina. Se establece que la protrombina puede purificarse en un intercambiador aniónico y después someterse a inactivación de virus mediante, por ejemplo, pasteurización antes de la activación para formar trombina. Sin embargo, no hay sugerencia en D3 de que la activación del virus pueda llevarse a cabo mediante tratamiento con solvente-detergente de la protrombina. Además, no hay sugerencia de que la protrombina pueda activarse para formar trombina mientras se enlaza a una resina de intercambio aniónico.

D4 (WO 00/71153) describe simplemente el uso de kits de trombina-fibrinógeno como medicamentos. Hay referencia a la trombina que es "de virus inactivados", pero no hay descripción de cómo se prepará exactamente.

135 40

D7 (EP-A 116958) describe un método para la inactivación de virus en líquidos biológicos por tratamiento con solvente-detergente. No describe ningún método para la preparación de trombina a partir de protrombina.

Nada del arte previo habría guiado a una persona experimentada a los procesos reivindicados, en donde la trombina se obtiene a partir de la protrombina tratada con solvente-detergente enlazada a un medio de intercambio aniónico. El método de la invención permite la preparación eficiente de la trombina segura con respecto a los virus, sin la necesidad de la adición de trombina o tromboplastina, que son éstas mismas fuentes de contaminación viral potencial. El proceso de la presente invención usa iones metálicos para activar la protrombina para formar trombina, permitiendo la preparación de trombina con virus inactivados altamente pura en una sola etapa.

Desde el punto de vista de lo anterior, se espera que el Examinador pueda reconocer ahora un paso inventivo para las reivindicaciones 1-8 de la presente solicitud. Por lo tanto, se espera que el Examinador pueda presentar un Reporte de Examen Preliminar Internacional que indique un paso inventivo para al menos las reivindicaciones 1-8 de la presente solicitud.

Por favor confirmar de recibido de esta carta y anexos regresando la forma EPO 1037 que acompaña la copia de confirmación.

Muy Sinceramente,
Frank B. Dehn & CO.

Annabel R. Beacham

PCT
PETITORIO

El abajo firmante solicita que la presente solicitud Internacional sea procesada de acuerdo al Tratado de Cooperación en Materia de Patentes

Para uso de la Oficina receptora solamente

No. de Solicitud Internacional

Fecha de presentación internacional

Nombre de la oficina receptora y "Solicitud Internacional de PCT"

Referencia de archivo del solicitante o agente
(si se desea) (12 caracteres máximo) 61.78607/001

Cuadro No. I TÍTULO DE LA INVENCIÓN

Proceso para la preparación de trombina

Cuadro No. II SOLICITANTE

☐ Esta persona es también inventor

Nombre y dirección: (Apellido, seguido por nombre propio; para una entidad legal, designación oficial completa. La dirección debe incluir código postal y nombre del país. El país de la dirección indicada en este cuadro es la del estado solicitante (es decir, el país) de residencia si no del estado al que se indica en seguida)

Oak House
Reeds Crescent
Walford
Hertfordshire
WD1 1 QH
Reino Unido

No. de teléfono

No. de facsímil

No. de teleimpresora

No. de Registro del Solicitante con la Oficina

Estado (esto es, país) de nacionalidad:

GB

Estado (esto es, país) de residencia:

GB

Esta persona es solicitante para los propósitos de ☐ todos los países designados ☒ todos los países designados excepto los Estados Unidos de Norteamérica ☐ los Estados Unidos de Norteamérica solamente ☐ los países indicados en el cuadro complementario

Cuadro No. III SOLICITANTES ADICIONALES Y/O INVENTORES (ADICIONALES)

Nombre y dirección: (Apellido, seguido por nombre propio; para una entidad legal, designación oficial completa. La dirección debe incluir código postal y nombre del país. El país de la dirección indicada en este cuadro es la del estado solicitante (es decir, el país) de residencia si no del estado al que se indica en seguida)

FELDMAN, Peter
Bio Products Laboratory
Dagger Lane, Elstree
Hertfordshire
WD6 3BX
Reino Unido

Esta persona es:

☐ solicitante solamente

☒ solicitante e inventor

☐ inventor solamente (si se marca este cuadro, no llenar lo que sigue)

No. de Registro del Solicitante con la Oficina

Estado (esto es, país) de nacionalidad:

GB

Estado (esto es, país) de residencia:

GB

Esta persona es solicitante para los propósitos de ☐ todos los países designados ☐ todos los países designados excepto los Estados Unidos de Norteamérica ☒ los Estados Unidos de Norteamérica solamente ☐ los países indicados en el cuadro complementario

☒ Los solicitantes adicionales y/o inventores (adicionales) se indican en una hoja de continuación.

Cuadro No. IV AGENTE O REPRESENTANTE COMÚN; O DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA

La persona identificada posteriormente es/ha sido citada para actuar en nombre del (los) solicitante(s) ante las Autoridades Internacionales competentes como: ☒ agente ☐ representante común

Nombre y dirección: (Apellido, seguido por nombre propio; para una entidad legal, designación oficial completa. La dirección debe incluir código postal y nombre del país).

Frank B. Dehn & Co.
179 Queen Victoria Street
Londres
EC4V 4EL
GB

No. de teléfono

0044 1273 244200

No. de facsímil

0044 20 7206 0700

No. de teleimpresora

No. de Registro del Solicitante con la Oficina

☐ Dirección para la Correspondencia: Marque este recuadro cuando ningún agente o representante común es/haya sido citado y el espacio anterior se usa en su lugar para indicar una dirección especial a la cual se debe enviar la correspondencia.

Cuadro No. III SOLICITANTES ADICIONALES Y/O INVENTORES (ADICIONALES)

Si ninguno de los siguientes subcuadros es utilizado, esta hoja no deberá incluirse en la solicitud

Nombre y dirección (Apellido, seguido por nombre propio; para una entidad legal, designación oficial completa. La dirección debe incluir código postal y nombre del país. El país de la dirección indicada en este cuadro es la del estado solicitante (es decir el país) de residencia si no del estado de residencia indica en seguida). CANNOLLY, Caroline West Research Office Administration Building Western infirmary Glasgow G11 6NT, Reino Unido	Esta persona es: ☐ solicitante solamente ☒ solicitante e inventor ☐ inventor solamente (si se marca este cuadro, no llenar lo que sigue) No. de Registro del Solicitante con la Oficina
---	--

Estado (esto es, país) de nacionalidad: GB	Estado (esto es, país) de residencia: GB
---	---

Esta persona es solicitante para los propósitos de	☐ todos los países designados	☐ todos los países designados excepto los Estados Unidos de Norteamérica	☒ los Estados Unidos de Norteamérica solamente	☐ los países indicados en la cuadro complementario
--	--	---	--	---

Nombre y dirección (Apellido, seguido por nombre propio; para una entidad legal, designación oficial completa. La dirección debe incluir código postal y nombre del país. El país de la dirección indicada en este cuadro es la del estado solicitante (es decir el país) de residencia si no del estado de residencia indica en seguida). HARDWAY, Christopher Bio Products Laboratory Dagger Lane Elstree Hertfordshire WD6 3BX Reino Unido	Esta persona es: ☐ solicitante solamente ☒ solicitante e inventor ☐ inventor solamente (si se marca este cuadro, no llenar lo que sigue) No. de Registro del Solicitante con la Oficina
---	--

Estado (esto es, país) de nacionalidad: GB	Estado (esto es, país) de residencia: GB
---	---

Esta persona es solicitante para los propósitos de	☐ todos los países designados	☐ todos los países designados excepto los Estados Unidos de Norteamérica	☒ los Estados Unidos de Norteamérica solamente	☐ los países indicados en la cuadro complementario
--	--	---	--	---

Nombre y dirección (Apellido, seguido por nombre propio; para una entidad legal, designación oficial completa. La dirección debe incluir código postal y nombre del país. El país de la dirección indicada en este cuadro es la del estado solicitante (es decir el país) de residencia si no del estado de residencia indica en seguida). EVANS, David Bio Products Laboratory Dogger Lane Elstree Hertfordshire WD6 3BX Reino Unido	Esta persona es: ☐ solicitante solamente ☒ solicitante e inventor ☐ inventor solamente (si se marca este cuadro, no llenar lo que sigue) No. de Registro del Solicitante con la Oficina
---	--

Estado (esto es, país) de nacionalidad: GB	Estado (esto es, país) de residencia: GB
---	---

Esta persona es solicitante para los propósitos de	☐ todos los países designados	☐ todos los países designados excepto los Estados Unidos de Norteamérica	☒ los Estados Unidos de Norteamérica solamente	☐ los países indicados en la cuadro complementario
--	--	---	--	---

Nombre y dirección (Apellido, seguido por nombre propio; para una entidad legal, designación oficial completa. La dirección debe incluir código postal y nombre del país. El país de la dirección indicada en este cuadro es la del estado solicitante (es decir el país) de residencia si no del estado de residencia indica en seguida).	Esta persona es: ☐ solicitante solamente ☐ solicitante e inventor ☐ inventor solamente (si se marca este cuadro, no llenar lo que sigue) No. de Registro del Solicitante con la Oficina
---	---

Estado (esto es, país) de nacionalidad:	Estado (esto es, país) de residencia:
---	---------------------------------------

Esta persona es solicitante para los propósitos de	☐ todos los países designados	☐ todos los países designados excepto los Estados Unidos de Norteamérica	☐ los Estados Unidos de Norteamérica solamente	☐ los países indicados en la cuadro complementario
--	--	---	---	---

☐ Solicitantes adicionales y/o inventores (adicionales) se indican en una hoja de continuación.				
--	--	--	--	--

138

Recuadro No. V DESIGNACIÓN DE ESTADOS

Las siguientes designaciones se hacen mediante la presente bajo la regla 4.9(a):

Patente Regional

- ☒ **AP** Patente ARIPO: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leona, SZ Suazilandia, TZ República Unida de Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwé, y cualquier otro país el cual sea contratante del Protocolo de Harare y del PCT.
- ☒ **EA** Patente Euroasiática: AM Armenia, AZ Azerbaiyán, BY Bielorrusia, KG Kirgistan, KZ Kazajistán, MD República de Moldavia, RU Federación Rusa, TJ Tayikistán, TM Turkmenistán, y cualquier otro país el cual sea un Estado contratante de la Convención Euroasiática en Patentes y del PCT.
- ☒ **EP** Patente Europea: AT Austria, BE Bélgica, CH y LI Suiza y Liechtenstein, DE Alemania, DK Dinamarca, ES España, FR Francia, GB Reino Unido, GR Grecia, IE Irlanda, IT Italia, LU Luxemburgo, MC Mónaco, NL Países Bajos, PT Portugal, SE Suecia, TR Turquía y cualquier otro país el cual sea un estado contratante de la Convención de Patentes Europea y del PCT.
- ☒ **OA** Patente OAPI: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF República Centro Africana, CG Congo, CI Costa de Marfil, CM Camerún, GA Gabón, GN Guinea, ML, Mali, MR Mauritania, NE Nigeria, SN Senegal, TD Chad, TG Togo y cualquier otro país el cual sea un estado miembro de la OAPI y un estado contratante del PCT (si se desea una clase de protección o tratamiento, especifique en la línea de puntos). GQ Guinea Ecuatorial

Patente Nacional (si se desea otra clase de protección o tratamiento, especifique en la línea de puntos):

- | | | |
|--|---|--|
| ☒ AE Emiratos Árabes Unidos | ☒ GH Ghana..... | ☒ MW Malawi..... |
| ☒ AG Antigua y Barbuda | ☒ GM Gambia..... | ☒ MX México..... |
| ☒ AL Albania..... | ☒ HR Croacia..... | ☒ MZ Mozambique..... |
| ☒ AM Armenia..... | ☒ HU Hungría..... | ☒ NO Noruega..... |
| ☒ AT Austria..... | ☒ ID Indonesia..... | ☒ NZ Nueva Zelanda..... |
| ☒ AU Australia..... | ☒ IL Israel..... | ☒ OM Oman..... |
| ☒ AZ Azerbaiyán..... | ☒ IN India..... | ☒ PH Filipinas..... |
| ☒ BA Bosnia y Herzegovina..... | ☒ IS Islandia..... | ☒ PL Polonia..... |
| ☒ BB Barbados..... | ☒ JP Japón..... | ☒ PT Portugal..... |
| ☒ BG Bulgaria..... | ☒ KE Kenia..... | ☒ RO Rumania..... |
| ☒ BR Brasil..... | ☒ KG Kirgistan..... | ☒ RU Federación Rusa..... |
| ☒ BY Bielorrusia..... | ☒ KP República Democrática Popular de Corea..... | ☒ SD Sudan..... |
| ☒ BZ Belice..... | ☒ KR República de Corea..... | ☒ SE Suecia..... |
| ☒ CA Canadá..... | ☒ KZ Kazajistán..... | ☒ SG Singapur..... |
| ☒ CH y LI Suiza y Liechtenstein..... | ☒ LC Santa Lucía..... | ☒ SI Eslovenia..... |
| ☒ CN China..... | ☒ LK Sri Lanka..... | ☒ SK Eslovaquia..... |
| ☒ CR Costa Rica..... | ☒ LR Liberia..... | ☒ SL Sierra Leona..... |
| ☒ CU Cuba..... | ☒ LS Lesotho..... | ☒ TJ Tayikistán..... |
| ☒ CZ República Checa..... | ☒ LT Lituania..... | ☒ TM Turkmenistán..... |
| ☒ DE Alemania..... | ☒ LU Luxemburgo..... | ☒ TR Turquía..... |
| ☒ DK Dinamarca..... | ☒ LV Letonia..... | ☒ TT Trinidad y Tobago..... |
| ☒ DM Dominicana..... | ☒ MA Marruecos..... | ☒ TZ República Unida de Tanzania..... |
| ☒ DZ Argelia..... | ☒ MD República de Moldavia..... | ☒ UA Ucrania..... |
| ☒ EE Estonia..... | ☒ MG Madagascar..... | ☒ UG Uganda..... |
| ☒ EC Ecuador..... | ☒ MK La antigua República Yugoslava de Macedonia..... | ☒ US Estados Unidos de Norteamérica..... |
| ☒ ES España..... | ☒ MN Mongolia..... | ☒ UZ Uzbekistán..... |
| ☒ FI Finlandia..... | | ☒ VN Vietnam..... |
| ☒ GB Reino Unido..... | | ☒ YU Yugoslavia..... |
| ☒ GD Granada..... | | ☒ ZA Sudáfrica..... |
| ☒ GE Georgia..... | | ☒ SW Zimbabwé..... |

Casilla de verificación reservada para los Países reservados que han llegado a ser parte del PCT después de la publicación de la presente hoja.

- ☒ NI Nicaragua .. ☐ .. ☐ ..
- ☒ PG Papua Nueva Guinea... ☐ .. ☐ ..

Declaración de Designación Precautoria: Además de las designaciones hechas anteriormente, la solicitante también hace bajo la regla 4.9(b) todas las designaciones las cuales serían permitidas bajo el PCT, excepto de toda la designación indicada en el cuadro suplementario como se excluye del alcance de esta declaración. El solicitante declara que aquellas designaciones adicionales están sujetas a confirmación y que cualquier designación la cual no sea confirmada antes de la expiración de los 15 meses a partir de la fecha de prioridad será considerada como abandono por el solicitante en la expiración de aquel límite de tiempo. (La confirmación de una designación consiste de la presentación de una notificación que especifique aquella designación y el pago de las cuotas de designación y confirmación. La confirmación debe llegar a la Oficina receptora dentro del límite de tiempo de 15 meses).

acional:
eptora

**quadro
rio
de la**

do acabo

de petitorio

Cuadro No. IX HOJA DE DECLARACIÓN: IDIOMA DE DEPÓSITO		No. de elementos
La presente solicitud internacional contiene: a) el número de hojas siguientes bajo la forma de pago: Petitorio (y comprende la o las hojas para declaración) : 5 Descripción (a excepción de la parte reservada para el listado de secuencias) : 32 Reivindicaciones : 3 Extracto : 1 Dibujos : 0 Total del número de hojas : 41 Parte de la descripción reserva un listado de secuencias (nombre real de las hojas si son parte de este depósito, bajo la forma de pago, que está o no igualmente depositada bajo la forma legible en computadora; ver b) siguiente): Número total de hojas : 41 b) parte de la descripción se reserva al listado de secuencias depositado bajo la forma legible en computadora i) ☐ solamente (en virtud de la instrucción 801.a)i)) ii) ☐ e igualmente bajo la forma de pago (en virtud de la instrucción 801.a)i)) Tipos u nombre de soporte (disquete, CD-ROM, CR-R y otros) los cuales representan la parte reservada al listado de secuencias (copias complementarias e indicadas en el punto 9.ii), en la columna de la derecha):	El o los elementos siguientes están acompañados por la presente solicitud internacional (verificar el o los casos apropiados e indicarlos en la columna de la derecha el número de elementos verificados): 1. ☒ costo de la hoja de cálculo 2. ☐ poder del apoderado firmado separado 3. ☐ original del poder general 4. ☐ copia del poder general del apoderado, número de referencia, si la hay 5. ☐ declaración que explique carencia de firma 6. ☐ documento(s) de prioridad identificado en el cuadro No. VI como en el cuadro(s): 7. ☐ traducción de la solicitud internacional en (idioma): 8. ☐ indicaciones separadas concernientes a los microorganismos depositados u otro material biológico. 9. ☐ listado de secuencia bajo la forma legible en computadora (indicar también el tipo y el nombre de soporte (disquete, CD-ROM, CD-R u otros)) i) ☐ copia proporcionada al final de la búsqueda internacional en virtud de la regla 13ava únicamente (y no como parte de la solicitud internacional) ii) ☐ (únicamente cuando el caso d)i) o b)ii) de la columna de la izquierda es marcada) hojas complementarias, incluyendo si fuera necesario, la hoja del descuento al final de la búsqueda internacional en virtud de la regla 13ava iii) ☐ con la declaración pertinente con respecto a la identidad de la copia o copias complementarias y la parte reservada para el listado de secuencias mencionado en la columna de la izquierda. 10. ☐ listado de secuencia bajo la forma legible en computadora (indicar también el tipo y el nombre de soporte (disquete, CD-ROM, CD-R u otros)) i) ☐ copia proporcionada al final de la búsqueda internacional en virtud de la regla 13ava únicamente (y no como parte de la solicitud internacional) ii) ☐ (únicamente cuando el caso d)i) o b)ii) de la columna de la izquierda es marcada) hojas complementarias, incluyendo si fuera necesario, la hoja del descuento al final de la búsqueda internacional en virtud de la regla 13ava iii) ☐ con la declaración pertinente con respecto a la identidad de la copia o copias complementarias y la parte reservada para el listado de secuencias mencionado en la columna de la izquierda 11. ☐ otros (especificar). P23/77	1
La figura de los dibujos la cual debe acompañar al extracto:		Idioma del archivo de la Solicitud internacional: Inglés

Cuadro No. IX FIRMA DEL SOLICITANTE O AGENTE

Enseguida de cada firma, indique el nombre de la persona que firma y la capacidad en la cual la persona firma (si tal capacidad no es obvia de la lectura del petitorio).

BEACHAM, Annabel Rose – Agente para el Solicitante

Para uso de la Oficina receptora solamente	
1. Fecha del recibo real de la solicitud internacional alegada:	2. Dibujos
3. Fecha corregida del vencimiento del recibo real a los documentos o dibujos recibidos posteriormente pero a tiempo que complementan la solicitud internacional alegada:	
4. Fecha del recibo a tiempo de las correcciones requeridas bajo el artículo 11(2) de PCT:	
5. Autoridad de Búsqueda Internacional especificada por el solicitante: ISA/	
6. ☐ Transmisión de copia de búsqueda retardada hasta que la cuota de búsqueda sea pagada	☐ recibidos: ☐ no recibidos:

Para uso de la Oficina Internacional solamente

Fecha del recibo de la copia de registro por la Oficina Internacional:

142
141

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05007425 00000000 Folios: 141
Fecha (AND): 2005-01-28 16:46:45
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2820 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ✓	()	(✓)
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes. ✕	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma Responsable:

Gaudia M Nueva

Fecha:

Folio 143

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor(a)
JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Oficio N°

12465

ASUNTO:	Radicación N°	05-7426
	Solicitud internacional	PCT/GB2003/02942
	Fecha inicio fase nacional	10/02/2005
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
- La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486/00.
- Si fuere el caso la solicitud debe contener la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional. (Art. 36.2.b) del tratado PCT).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 03 ABR 2005

202027

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Sede CAN: Tr. 40A No. 38-50 Conmutador: 3820840
Fax: 382 28 95. Línea 9900-910 185
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia