

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 466**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/74** (2006.01)

**C12N 9/96** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2005 E 08004770 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **04.06.2008 EP 1927658**

54 Título: **Composiciones de trombina**

30 Prioridad:

**22.06.2004 US 581824 P**

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

**12.02.2013**

73 Titular/es:

**ZYMOGENETICS, INC. (100.0%)  
Route 206 and Province Line Road  
Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**JIANG, SHAN;  
SENDEROFF, RICHARD I. y  
MEYER, JEFFREY D.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 395 466 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones de trombina

**Antecedentes de la invención**

5 La formulación de las proteínas farmacéuticas presenta desafíos significativos. Las proteínas poseen múltiples grupos funcionales además de una estructura tridimensional; por tanto, la degradación se produce tanto por la vía química (modificaciones que implican la formación de enlaces o escisión) como por la vía física (desnaturalización, agregación, adsorción, precipitación). Como cada proteína expresa una única combinación de aminoácidos, secuencia, punto isoeléctrico y otros determinantes, su respuesta a los cambios en condiciones de solución es impredecible y debe determinarse caso por caso. Las tentativas de prevenir una forma de degradación a menudo aumentan la tasa de otra.

La degradación de las proteínas puede evitarse o reducirse mucho por liofilización. Sin embargo, la liofilización requiere tiempo y es costosa, y puede causar la desnaturalización y la agregación de las proteínas si no se incluyen los excipientes adecuados. Como ocurre en la formulación en solución, la estabilización de las proteínas liofilizadas tiene que llevarse a cabo individualmente.

15 En el caso de la trombina, se puede usar cloruro sódico para mantener la estabilidad durante la purificación y el almacenamiento ya que reduce la agregación y la precipitación. Sin embargo, el cloruro sódico es un excipiente problemático en las formulaciones liofilizadas porque baja la temperatura de transición vítrea, con lo que se necesitan temperaturas primarias bajas y ciclos largos. Además, la trombina tiene que protegerse del desplegamiento y la agregación en la composición liofilizada.

20 La formulación ideal combinará la estabilidad durante la liofilización, así como el almacenamiento a largo plazo y el transporte con la facilidad de manejo y de uso.

El documento US-A-4923815 describe una composición estable de trombina desecada, que comprende sacáridos. Entre los sacáridos de interés se mencionan la sacarosa y el manitol.

**Descripción de la invención**

25 Dentro de un aspecto de la invención se proporciona una composición que esencialmente consiste en 0,1 mg/ml a 5,0 mg/ml de trombina, de un 2% a un 4% (p/v) de sacarosa, de un 3,5% a un 5% (p/v) de manitol, NaCl de 50 mM a 300 mM, CaCl<sub>2</sub> 0-5 mM, de un 0,03% a un 1% (p/v) de un tensioactivo o polietilenglicol de alto peso molecular, y un tampón aceptable fisiológicamente, en una solución acuosa con un pH de 5,7-7,4, en la que la concentración del tampón se selecciona para proporcionar un pH aproximadamente fisiológico tras la aplicación de la composición en un entorno quirúrgico y en la que la relación de manitol:sacarosa es mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1 (p/p).

30 Dentro de una realización de la invención, la relación entre manitol y sacarosa es 1,33:1 (p/p). Dentro de otras realizaciones de la invención, la relación molar de sacarosa:trombina es al menos de 700:1 o al menos 2000:1. Dentro de realizaciones adicionales de la invención, la trombina es trombina humana, incluyendo, por ejemplo, trombina recombinante humana. Dentro de otras realizaciones de la invención, la concentración de trombina es de 0,5-3,0 mg/ml o la concentración de trombina es de 1 mg/ml. Dentro de otras realizaciones de la invención, la concentración de sacarosa es del 3% (p/v) y/o la concentración de manitol es del 4% (p/v). Dentro de una realización adicional, el tensioactivo o polietilenglicol de alto peso molecular es PEG 3350. Dentro de una realización relacionada, el tensioactivo o polietilenglicol de alto peso molecular es PEG 3350 a una concentración del 0,1% (p/v). Dentro de realizaciones adicionales, el pH de la composición es 6,0. Dentro de realizaciones adicionales, el

35 tampón se selecciona del grupo que consiste en tampones de histidina, citrato, fosfato, Tris y succinato. Dentro de realizaciones relacionadas, el tampón es tampón de histidina, tal como el tampón de histidina 2,0-10 mM o el tampón de histidina 5 mM. Una de dichas composiciones de la presente invención consiste esencialmente en 0,1 mg/ml a 5,0 mg/ml de trombina, de un 2% a un 4% (p/v) de sacarosa, de un 3,5% a un 5% (p/v) de manitol, NaCl de 100 mM a 200 mM, CaCl<sub>2</sub> de 1 mM a 5 mM, de un 0,03% a un 1% (p/v) de PEG3350 e histidina de 2 mM a 10 mM en solución acuosa a pH 5,5 - 6,5, en la que la relación de manitol:sacarosa es mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1 (p/p). Otra de dichas composiciones de la invención consiste esencialmente en 1 mg/ml de trombina, un 3% (p/v) de sacarosa, un 4% (p/v) de manitol, CaCl<sub>2</sub> 4 mM, un 0,1% (p/v) de PEG3350, NaCl 150 mM e histidina 5 mM en solución acuosa a pH 6,0.

50 Dentro de un segundo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para preparar una composición de trombina liofilizada que comprende (a) proporcionar una composición acuosa que contiene trombina como se desveló anteriormente y (b) liofilizar la composición acuosa para formar una composición de trombina liofilizada.

Dentro de un tercer aspecto de la invención, se proporciona una composición de trombina liofilizada preparada por el procedimiento desvelado anteriormente. Dentro de una realización de la invención, la composición liofilizada está contenida en un recipiente sellado que tiene una etiqueta pegada a la superficie exterior del mismo. Dentro de una realización adicional de la invención, la composición en el recipiente sellado contiene de 2.500 a 20.000 unidades NIH de trombina. Dentro de una realización relacionada de la invención, la composición se proporciona en forma de un kit que comprende un recipiente sellado como se desveló anteriormente y un segundo recipiente sellado que

contiene un diluyente tal como, por ejemplo, una solución salina normal.

Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes al consultar la siguiente descripción detallada de la invención y los dibujos adjuntos. En los dibujos:

- 5 La Fig.1 ilustra el análisis de muestras extraídas antes y después de la liofilización de ciertas formulaciones de trombina por Dispersión de Luz en Ángulo Recto (RALS)  
 La Fig. 2 ilustra el análisis de ciertas formulaciones de trombina por RALS tras el almacenamiento durante trece semanas.  
 La Fig. 3 ilustra el análisis de ciertas formulaciones de trombina por RALS tras el almacenamiento durante seis meses.  
 10 La Fig. 4 ilustra el análisis de la estructura secundaria de la trombina por espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier usando cuatro formulaciones de trombina recombinante humana (etiquetadas como A, B, C y D).  
 La Fig. 5 ilustra el análisis de la estructura secundaria de la trombina por espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier usando cinco formulaciones de trombina recombinante humana (etiquetadas como T, A, B, C, y D).  
 15

Los intervalos numéricos (por ejemplo, "desde X a Y") incluyen los puntos finales a no ser que se especifique otra cosa.

La presente invención proporciona composiciones estabilizadas de trombina, incluyendo composiciones liofilizadas. Tal como se usa en el presente documento, "trombina" significa la enzima activada, también conocida como  $\alpha$ -trombina, que se obtiene como resultado de la escisión proteolítica de la protrombina (factor II). Como se desvela posteriormente, la trombina se puede preparar por diversos procedimientos conocidos en la técnica, y el término "trombina" no pretende implicar un procedimiento de producción en particular. La trombina humana es una proteína de 295 aminoácidos compuesta por dos cadenas polipeptídicas unidas por un enlace disulfuro. En la presente invención pueden usarse tanto trombinas humanas como no humanas. La trombina se utiliza en medicina como un agente hemostático y como un componente de los adhesivos de tejidos.  
 20  
 25

Las trombinas tanto humana como no humana (por ejemplo, bovina) se preparan de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. La purificación de la trombina a partir del plasma se desvela, por ejemplo, por Bui-Khac y col., Patente de Estados Unidos N° 5.981.254. La purificación de la trombina a partir de fracciones del plasma, tal como la fracción III de Cohn, se desvela por Fenton y col., J. Biol. Chem. 252: 3587-3598, 1977. La trombina recombinante puede prepararse a partir de un precursor de pretrombina por activación con un activador de veneno de serpiente como se desveló en la Patente de Estados Unidos N° 5.476.777. Los activadores de veneno adecuados incluyen la ecarina y el activador de protrombina de *Oxyuranus scutellatus*.  
 30

Dentro de la presente invención, la trombina se formula en una solución acuosa débilmente tamponada que contiene sacarosa, manitol, cloruro sódico, un tensioactivo o polietilenglicol de alto peso molecular (HMW-PEG) y, opcionalmente, cloruro cálcico. Los intervalos de concentración de estos componentes se muestran en la Tabla 1. Las concentraciones que se expresan como porcentajes son porcentajes en peso por volumen.  
 35

**Tabla 1**

<b>Trombina</b>	0,01-5,0 mg/ml
<b>Sacarosa</b>	2%-4%
<b>Manitol</b>	3,5%-5%
<b>NaCl</b>	50-300 mM
<b>Tensioactivo o HMW-PEG</b>	0,03%-1%
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0-5 mM
<b>pH</b>	5,7-7,4

La concentración de trombina dentro de la formulación de la presente invención puede variar dependiendo de para qué se quiera utilizar, incluyendo la concentración deseada del producto reconstituido. La trombina se incluye en la formulación a una concentración de 0,01-5,0 mg/ml, más comúnmente de 0,1-5,0 mg/ml, y típicamente de 0,5-3,0 mg/ml. Dentro de ciertas realizaciones de la invención, la concentración de trombina es de 1,0 mg/ml.  
 40

Los inventores han descubierto que la relación entre manitol y sacarosa afecta significativamente al desplegamiento de la proteína durante la liofilización. El manitol se incluye como un agente para dar mayor volumen, lo que mejora la eficacia del ciclo de liofilización y el aspecto del producto liofilizado. La sacarosa se incluye como un estabilizador (lioprotector), reduciendo el desplegamiento de la trombina durante la liofilización y durante el almacenamiento. Las formulaciones que tenían una relación de manitol:sacarosa de 5:1 (p/p) o mayor fueron inaceptables; las que tenían una relación de 2,5:1 o menor parecían estables al analizarse con espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR). Las relaciones de 1:1 o menores mostraron agregación/precipitación en solución (tras la reconstitución) al  
 45

medirse por dispersión de luz en ángulo recto (RALS) y no formaban un aglutinado aceptable tras la liofilización. Por tanto, dentro de la presente invención la relación de manitol:sacarosa será mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1.

5 El NaCl se incluye en la formulación para reducir la agregación y/o la precipitación. Como se ha indicado anteriormente, el NaCl puede ser problemático en el proceso de liofilización. Dentro de la formulación de la presente invención, el NaCl se incluye a una concentración de 50 mM a 300 mM. Dentro de ciertas realizaciones de la invención, la concentración de NaCl es de 75 mM a 250 mM, 100 mM a 200 mM, o 150 mM.

10 La formulación de trombina de la presente invención está tamponada para proporcionar estabilidad durante la formulación y para optimizar la actividad tras la reconstitución. Aunque sin el deseo de limitarse por teoría alguna, se cree que la degradación autolítica de la trombina aumenta a medida que aumenta el pH por encima de 6,0, y la tasa de precipitación aumenta a medida que el pH desciende por debajo de 6,0. Por tanto, es deseable preparar la trombina a un pH ligeramente ácido o próximo a la neutralidad para limitar la pérdida de actividad debida a la autólisis (formación de productos inactivos por degradación autolítica incluyendo la  $\beta$ - y la  $\gamma$ -trombina). Sin embargo, para proporcionar una óptima actividad biológica en el momento de su utilización, se desea que el pH sea aproximadamente el fisiológico. La presente invención se enfrenta a estas necesidades conflictivas mediante el uso de un tampón débil que es eficaz a un pH de ligeramente ácido a aproximadamente neutro (es decir, un pH de 5,7-7,4), pero que permitirá que el pH alcance un valor aproximadamente fisiológico (es decir, un pH de 6,8-7,5, preferentemente un pH de 7,0-7,5, más preferentemente un pH de 7,35-7,45) cuando la trombina se aplique a un tejido sangrante en un entorno quirúrgico. Dentro de la presente invención, la solución de trombina está tamponada a un pH de 5,7-7,4, comúnmente de 6,0-6,5 y, dentro de ciertas realizaciones, de 6,0. Los tampones adecuados incluyen, además de histidina, otros tampones fisiológicamente aceptables que son eficaces dentro del intervalo reseñado de pH y que permitirán que la solución alcance un pH aproximadamente fisiológico durante la aplicación de la composición en un entorno quirúrgico. Los ejemplos de dichos tampones incluyen fosfato, citrato, Tris (2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol) y succinato. Dentro de ciertas realizaciones de la invención, el tampón de histidina se incluye a 1-20 mM, 2-10 mM o 5 mM.

25 Las concentraciones adecuadas de otros tampones dentro de la presente invención pueden determinarse rápidamente por un experto habitual en la materia. Los tampones de la formulación pueden ensayarse añadiendo sangre y midiendo el pH de la solución resultante. En un ensayo modelo, se añaden progresivamente alícuotas de sangre de conejo a distintos tampones y se mide el pH después de cada adición. Cuando los tampones de histidina se ensayan en dicho ensayo, la histidina 3,2 mM, 5 mM, 12,8 mM y 20 mM se neutraliza por la adición de no más de 1,0 volúmenes de sangre. Por el contrario, un tampón de succinato 160 mM y un tampón de fosfato 90 mM/histidina 12,8 mM no produjeron una mezcla con un pH por encima de 7,0 incluso tras la adición de 2-3 volúmenes de sangre.

35 Dentro de la presente invención, se incluye un tensioactivo o polietilenglicol de alto peso molecular (PEG) para prevenir la agregación/precipitación de la trombina inducidas por cizalladura y las pérdidas por adsorción en las soluciones previas a la liofilización o tras la reconstitución del producto liofilizado. Los tensioactivos adecuados útiles en este aspecto incluyen óxidos de polietileno, ésteres del sorbitán, los alquil éteres de polietileno, glicéridos de ácidos grasos (por ejemplo, el monooleato de glicerilo y el monoestearato de glicerilo), ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitán (por ejemplo, el polisorbato 20 (monooleato de polioxietileno sorbitán) y el polisorbato 80 (monooleato de polioxietileno sorbitán)) y similares. Los polietilenglicoles de alto peso molecular incluyen los que tienen pesos moleculares de 400 a 8000, tales como PEG 400, PEG 1000, PEG 3350, PEG 5000 y PEG 8000. Un polietilenglicol de alto peso molecular ejemplar es el PEG 3350. La concentración preferida para el PEG 3350 es del 0,1-1%. Aunque el PEG 3350 al 0,03% inhibe eficazmente la agregación/precipitación inducida por la cizalladura y las pérdidas de adsorción, normalmente se utilizarán concentraciones un poco mayores en la formulación inicial para compensar la dilución que sigue a la reconstitución. Por ejemplo, una típica dosis unitaria de trombina puede prepararse llenando un vial con 1,6 ml de una solución de 1,0 mg/ml (3200 U/mg) (aproximadamente 5000 U NIH/vial) y liofilizándolo. El producto liofilizado, cuando se reconstituye con 5 ml de solución salina normal, proporciona una concentración de trombina de aproximadamente 1000 U NIH/ml (0,32 mg/ml). Si la concentración de PEG 3350 en la formulación inicial es del 0,1%, la concentración en el producto reconstituido será del 0,03%.

45 Dentro de ciertas realizaciones de la invención, el  $\text{CaCl}_2$  se incluye en la formulación para promover la hemostasia, ya que es necesario para activar varios factores de la coagulación sanguínea (por ejemplo, el Factor IX, el Factor X). Cuando se incluye, la concentración de  $\text{CaCl}_2$  en la formulación es de hasta 5 mM, generalmente de 1-5 mM, comúnmente 4 mM. La inclusión de cloruro cálcico puede mejorar también la estabilidad física de la trombina.

55 Para el almacenamiento a largo plazo, la solución acuosa se reparte en alícuotas en viales estériles, ampollas u otros recipientes y se liofiliza de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. El producto liofilizado aparece como un polvo o un aglutinado, prefiriéndose la forma aglutinada. A continuación se sellan los recipientes. Es preferible usar un sellado que permita más tarde la inyección del diluyente en el recipiente a través del sello. El recipiente se etiqueta de acuerdo con la práctica convencional en el campo farmacéutico.

En una realización de la invención, el recipiente se proporciona en un kit con un segundo recipiente que contiene un diluyente. Los diluyentes adecuados incluyen solución salina normal para inyección y agua para inyección. El kit puede además comprender un dispositivo de aplicación tal como un pulverizador, una jeringa o similar.

5 Para utilizarla, la composición de trombina liofilizada se reconstituye con un diluyente adecuado a la concentración deseada, generalmente de aproximadamente 100 U NIH/ml a aproximadamente 5.000 U NIH/ml, típicamente aproximadamente 1.000 U NIH/ml, aunque la concentración real se determinará por el médico de acuerdo con las necesidades del paciente individual. La trombina puede aplicarse en el tejido sangrante para conseguir la hemostasia, a menudo en combinación con una esponja de gelatina absorbible. La trombina puede usarse también como un componente de un adhesivo de tejidos o un pegamento de fibrina. Estos y otros usos de la trombina se conocen en este campo.

La invención se ilustra adicionalmente con los siguientes ejemplos no limitantes.

**Ejemplos**

10 **Ejemplo 1**

Se formuló trombina recombinante humana (Trombina rh) a 1 mg/ml en histidina 5 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM y PEG3350 al 0,1%, a un pH de 6,0 con concentraciones variables de manitol y sacarosa, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Formulación	Manitol	Sacarosa
T	5%	0,5%
A	5%	1%
B	5%	2%
C	5%	3%
D	4%	3%
E	3%	3%
F	--	5%

15 Se depositaron alícuotas de 1,6 ml de las soluciones en viales y se liofilizaron en las condiciones que se muestran en la Tabla 3. Para los análisis posteriores, cuando fue necesario, las muestras liofilizadas se reconstituyeron con agua. Las observaciones visuales de las muestras liofilizadas y reconstituidas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3

Formulación	Refrigeración y Atemperado	Secado Primario	Secado Secundario
T	0,5 °C/min a 5 °C, mantenido 0,5 h 0,25 °C/min a -50 °C, mantenido 2 h 0,25 °C/min a -30 °C, mantenido 3 h 0,25 °C/min a -50 °C, mantenido 2 h	0,5 °C/min a -10 °C, mantenido 16 h  60 m Torr	0,2 °C/min a 30 °C, mantenido 24 h  60 m Torr
A,B, C,D, E,F	0,5 °C/min a 5 °C, mantenido 2 h 0,5 °C/min a -50 °C, mantenido 2 h 0,25 °C/min a -20 °C, mantenido 2 h 0,25 °C/min a -25 °C, mantenido 2 h 0,25 °C/min a -50 °C, mantenido 2 h	0,5 °C/min a -30 °C mantenido 10 h 0,5 °C/min a -25 °C mantenido 10 h  0,5 °C/min a -20 °C mantenido 10 h 0,5 °C/min a -15 °C mantenido 10 h 60 m Torr	0,5 °C/min a 25 °C mantenido 24 h  0,5 °C/min a 30 °C mantenido 8 h  0,5 °C/min a 20°C mantenido 6 h 60 m Torr

Tabla 4

Formulación	Sólido Liofilizado	Solución Reconstituida
T	Aglomerado blanco	Transparente
A	Aglomerado blanco	Transparente
B	Aglomerado blanco	Transparente
C	Aglomerado blanco	Transparente
D	Aglomerado blanco	Transparente
E	Aglomerado semi-colapsado blanco o polvo blanco	Transparente
F	Polvo blanco	Transparente
A,B, C,D, E,F		

**Ejemplo 2**

Las formulaciones A, B, C, D, E y F de la Trombina rh se analizaron para detectar la presencia de agregados/precipitados en la solución. Las muestras obtenidas antes y después de la liofilización se analizaron por Dispersión de Luz en Ángulo Recto (RALS) utilizando un espectrofluorómetro continuo (QUANTAMASTER QM4, Photon Technology International, Inc., Lawrenceville, NJ). Las longitudes de onda de excitación y emisión se ajustaron a 320 nm. Las muestras se cargaron en un vial de cuarzo de 1 cm de longitud de trayectoria. Las aberturas de la rendija se regularon a 2 nm y las señales se recogieron a 1 punto/seg. durante 60 segundos. La corriente aplicada fue de 75 vatios. Los valores presentados (véase la Fig.1) fueron los recuentos medios recogidos durante 60 segundos. En la formulación A se observó una dispersión significativa de la luz significativa, coherente con agregación/precipitación después de la reconstitución. Las formulaciones E y F no produjeron un aglomerado aceptable tras la liofilización.

**Ejemplo 3**

La recuperación de la Trombina rh tras la liofilización se midió usando cromatografía de fase inversa (RP-HPLC). Para determinar el porcentaje de agregado soluble en las muestras de ensayo se usó cromatografía de exclusión por tamaños (SE-HPLC). Las formulaciones A, B, C, D, E y F se analizaron antes de la liofilización y después de la liofilización y reconstitución.

Para la RP-HPLC, las muestras de ensayo y el patrón de referencia (Trombina rh, 1 mg/ml en tampón de dilución (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,0)) se filtraron usando unidades de filtro para centrífuga (0,22 µm) (SPIN-X; Corning Life Sciences, Action, Mass.) a 14.000 rpm (20.800 RCF). Se empleó un intervalo de curva patrón de 5 a 40 µg, inyectando las muestras a aproximadamente un 90% del límite superior de cuantificación. Los valores de pureza se determinaron basándose en el área de pico principal con respecto al área total del pico integrada. Los análisis se llevaron a cabo usando un sistema de HPLC (Serie 1100; Agilent Technologies, Palo Alto, California) configurado con:

- Un kit de bomba binaria con lavado de sellado (G1312A)
- Desgasificador del disolvente de 4 canales (G1322A)
- Automuestreador termostatzado (G1329A/G1330A)
- Kit de mejora para aumentar el volumen que utiliza una jeringa de 900 µl (G1363A)
- Compartimiento de columna termostatzado con dos intercambiadores de calor (G1316A)
- Kit de mejora de conexión de columnas (G1353A)
- Detector de diodos (G1315B) con celda de flujo de 10 mm/13 µl
- Software CHEMSTATION Agilent (Revisión A.08.03)

Para la SE-HPLC, las muestras de ensayo y el patrón de referencia se filtraron usando unidades de filtro para centrífuga (0,22 µm) a 14.000 rpm (20.800 RCF). Se utilizó un intervalo de curvas patrón de 5,1 a 102 µg, inyectando las muestras aproximadamente a un 90% del límite superior de cuantificación. El porcentaje de agregados se determinó basándose en el área de los picos detectados que precedían al pico principal de Trombina rh con respecto al área total del pico integrada. El análisis se llevó a cabo utilizando un sistema de HPLC como se desveló anteriormente.

Estos análisis mostraron un incremento en la recuperación de la Trombina rh tras la liofilización con un aumento del contenido de sacarosa (≥3%) como se muestra en las Tablas 5 y 6. Los datos se presentan como concentración de Trombina rh (mg/ml). La observación de que el incremento del agregado soluble no necesariamente se relacionaba con menor recuperación, es coherente con la formación de agregados insolubles de Trombina rh durante la liofilización.

Tabla 5

RP-HPLC						
Formulación:	A	B	C	D	E	F
Pre-liofilización	1,03	1,06	1,02	1,04	1,03	1,04
Reconstituida:	0,91	0,92	0,93	0,94	0,96	0,96
% Recuperado	88,3%	86,8%	91,2%	90,4%	93,2%	92,3%

Tabla 6

% de agregado soluble por SE-HPLC						
Formulación	A	B	C	D	E	F
Pre-liofilización	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6
Post-liofilización	0,6	0,7	0,7	0,7	0,5	0,5

**Ejemplo 4**

5 La estabilidad de las formulaciones de Trombina rh en el almacenamiento se estudiaron en un periodo de 6 meses. Se almacenaron muestras liofilizadas de las formulaciones A, B, C, D, E y F a 40 °C y a 25 °C y se analizó su contenido (la concentración de trombina) por RP-HPLC a los 0, 1, 2, 3 y 6 meses como se ha desvelado anteriormente. A ambas temperaturas, la formulación A, tras la reconstitución, se volvió turbia después de dos meses (Tabla 7). Las formulaciones E y F produjeron aglomerados inaceptables y no se analizaron después del punto temporal de los 0 meses. La estabilidad, expresada como % de recuperación, se muestra en las Tablas 8 y 9.

Tabla 7

Temperatura	Tiempo	T	A	B	C	D
-20 °C	0	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
	1 mes	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
	2 meses	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
	3 meses	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
	6 meses	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
5 °C	1 semana	Ligeramente Turbio	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
	2 semanas	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
	1 mes	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
	2 meses	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
	3 meses	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
	6 meses	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
25 °C	1 semana	Ligeramente Turbio	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
	2 semanas	Ligeramente Turbio	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
	1 mes	Ligeramente Turbio	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
	2 meses	Transparente	Ligeramente Turbio	Transparente	Transparente	Transparente
	3 meses	Ligeramente Turbio	Ligeramente Turbio	Transparente	Transparente	Transparente
	6 meses	Transparente	Ligeramente Turbio	Transparente	Transparente	Transparente
40 °C	1 semana	Ligeramente Turbio	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
	2 semanas	Ligeramente Turbio	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
	1 mes	Ligeramente Turbio	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
	2 meses	No ensayado	Ligeramente Turbio	Transparente	Transparente	Transparente
	3 meses	No ensayado	Ligeramente Turbio	Transparente	Transparente	Transparente
	6 meses	No ensayado	Ligeramente Turbio	Transparente	Transparente	Transparente

Tabla 8

% de recuperación de trombina durante el almacenamiento a 40 °C							
Formulación	Meses						
	0	0,25	0,5	1	2	3	6
T	100	87,5	83,3	84,4	n.e.	n.e.	n.e.
A	100	n.e.	n.e.	95,6	94,5	92,3	90,1
B	100	n.e.	n.e.	96,7	98,9	95,7	92,4
C	100	n.e.	n.e.	96,8	95,7	93,5	91,4
D	100	n.e.	n.e.	96,9	97,9	95,7	93,6
n.e.= no ensayado							

Tabla 9

Formulación	Meses					
	0	1	2	3	6	12
Tox	100	97,9	93,8	94,8	94,8	93,4
A	100	101	98,9	98,9	95,6	96,7
B	100	100	100	97,8	95,7	97,8
C	100	98,9	100	96,8	n.r.	100
D	100	98,9	98,9	97,9	97,9	97,9
n.e = No ensayado.						

**Ejemplo 5**

5 Las muestras liofilizadas de las formulaciones A, B, C, D, E y F se almacenaron a 40 °C y a 25 °C y se analizaron a los 0, 1, 2, 3, y 6 meses para detectar la presencia de impurezas de alto peso molecular (agregado soluble) por SE-HPLC como se desveló anteriormente. Los resultados, mostrados en la Tabla 10, indicaron que en la formulación T (que contenía la menor cantidad de sacarosa), tras una semana se detectaba un aumento del agregado soluble. Sin embargo, en las formulaciones que contenían un 1% o más de sacarosa, no se encontraron incrementos significativos después de seis meses. Las formulaciones E y F produjeron aglomerados inaceptables y no se analizaron después del punto temporal de 0 meses.

10

Tabla 10

% de agregados; almacenamiento a 40 °C							
Formulación	Meses						
	0	0,25	0,5	1	2	3	6
T	0,3	1,1	1,1	1,1	n.e.	n.e.	n.e.
A	0,6	n.e.	n.e.	0,7	0,8	0,6	0,8
B	0,7	n.e.	n.e.	0,6	0,6	0,5	0,9
C	0,7	n.e.	n.e.	0,6	0,6	0,6	0,6
D	0,7	n.e.	n.e.	0,6	0,6	0,6	0,7
n.e. = No ensayado							

Tabla 11

% de agregados; almacenamiento a 25 °C						
Formulación	Meses					
	0	1	2	3	6	12
T	0,3	0,4	0,5	0,5	0,7	0,5
A	0,6	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6
B	0,7	0,8	0,7	0,6	0,8	0,6
C	0,7	0,8	0,8	0,6	0,6	0,6
D	0,7	0,7	0,6	0,6	0,7	0,6

**Ejemplo 6**

15 Se almacenaron muestras liofilizadas de las formulaciones A, B, C, y D durante trece semanas y seis meses a -20 °C, 5 °C, 25 °C y 40 °C y después se analizaron por RALS como se desveló en el ejemplo 2, anteriormente. Los incrementos en la dispersión de la luz medidos por RALS se asociaron con la presencia de agregados solubles y/o insolubles. Los resultados, mostrados en las Tablas 12 y 13 (como cuentas por segundo), y representados gráficamente en las Figs. 2 y 3, indicaron que las Formulaciones B, C y D eran más estables que la Formulación A con respecto a la agregación durante el almacenamiento en todas las condiciones de ensayo. Debido a las mínimas



variaciones instrumentales entre los puntos temporales de la semana 13 y el mes 6, no deben compararse los números absolutos de dos puntos temporales; los datos del RALS se deben comparar solo entre las formulaciones ensayadas al mismo tiempo.

Tabla 12

13 semanas				
Temperatura de almacenamiento	Formulación			
	A	B	C	D
-20 °C	870.148,3	220.321,1	174.001,5	175.358,3
5 °C	917.635,8	209.274,9	298.378,7	183.227,1
25 °C	1.442.075	243.777,1	160.173,6	211.948,2
40 °C	3.746.816	1.196.508	1.245.188	1.049.673

Tabla 13

6 Meses				
Temperatura de almacenamiento	Formulación			
	A	B	C	D
-20 °C	377.158,2	72.443,12	74.719,25	92.018,51
5 °C	438.323,8	100.675,1	100.185,1	76.518,18
25 °C	705.247,2	175.997,6	134.422,6	92.118,5
40 °C	1.824.263	438.520,7	455.521,4	446.050,9

## 5 Ejemplo 7

Las muestras liofilizadas de las formulaciones A, B, C y D se analizaron por espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) para comparar la estructura secundaria de la Trombina rh en estado liofilizado. Los espectros infrarrojos se obtuvieron con un espectrómetro FTIR (FRLA2000-104, ABB Inc., Norwalk, Conn.). Las muestras liofilizadas se mezclaron con bromuro potásico (BrK) (en una relación aproximada de Trombina rh:BrK 1:100) y se prensaron para formar pastillas. Los espectros se recogieron en modo de transmisión de un solo haz. Para reducir las interferencias debidas a los excipientes y el vapor de agua, se restaron los espectros del placebo y vapor de agua de los espectros de la proteína usando un software analítico (BOMEN-GRAMS/32 AI (Versión 6.01); ABB Inc.). Las segundas derivadas de los espectros se crearon usando la función Savitzky-Golay de segundo grado. Las formulaciones de Trombina rh se compararon en la región de amida I ( $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ). Como se muestra en la Fig. 4, se obtuvieron espectros similares para las formulaciones B, C, y D, mientras que la formulación A dio un espectro diferente.

Después, se ensayaron tres réplicas de la formulación A por medio de FTIR, como se desveló anteriormente. Los espectros resultantes fueron esencialmente idénticos.

Las formulaciones A, B, C, y D posteriormente se compararon con una formulación que contenía un 5% de manitol y un 0,5% de sacarosa (Formulación T). La FTIR se realizó como se desveló anteriormente. Como se muestra en la Fig. 5, las Formulaciones B, C y D dieron espectros similares, mientras que los espectros de las formulaciones que contenían el 5% de manitol y el 1% de sacarosa o el 0,5% de sacarosa indicaban unos espectros diferentes. Son coherentes con estos hallazgos los incrementos en la RALS que se observaron después de la liofilización, cuando las formulaciones que contenían  $\leq 1\%$  de sacarosa se compararon con las que tenían  $\geq 2\%$  de sacarosa (Ejemplo 6). Estos datos sugieren que la trombina está parcialmente desplegada en las formulaciones que contienen  $\leq 1\%$  de sacarosa (lo que conduce a un aumento de agregados insolubles tras la reconstitución), mientras que la estructura secundaria de la trombina se estabiliza en presencia de  $\geq 2\%$  de sacarosa durante la liofilización.

Otras realizaciones de la invención

1. Una composición que consiste esencialmente en

- de 0,1 mg/ml a 5,0 mg/ml de trombina;
- de un 2% a un 4% (p/v) de sacarosa;
- de un 3,5% a un 5% (p/v) de manitol;
- NaCl de 50 mM a 300 mM;
- CaCl<sub>2</sub> 0-5 mM;
- de un 0,03% a un 1% (p/v) de un tensioactivo o polietilenglicol de alto peso molecular; y un tampón fisiológicamente aceptable,

## ES 2 395 466 T3

en una solución acuosa a pH 5,7 – 7,4, en la que la concentración del tampón se selecciona para proporcionar un pH aproximadamente fisiológico tras la aplicación de la composición en un entorno quirúrgico y en la que la relación de manitol:sacarosa es mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1 (p/p).

2. La composición de la realización 1, en la que la relación de manitol:sacarosa es de 1,33:1 (p/p).

5 3. La composición de la realización 1, en la que la relación molar de sacarosa:trombina es al menos de 700:1.

4. La composición de la realización 1, en la que la relación molar de sacarosa:trombina es al menos de 2000:1.

5. La composición de la realización 1, en la que la trombina es trombina humana.

6. La composición de la realización 1, en la que la trombina es trombina recombinante humana.

7. La composición de la realización 1, en la que la concentración de trombina es de 0,5 – 3,0 mg/ml.

10 8. La composición de la realización 1, en la que la concentración de trombina es de 1 mg/ml.

9. La composición de la realización 1, en la que la concentración de sacarosa es del 3% (p/v).

10. La composición de la realización 1, en la que la concentración de manitol es del 4% (p/v).

11. La composición de la realización 1, en la que la concentración de la sacarosa es del 3% (p/v) y la concentración de manitol es del 4% (p/v).

15 12. La composición de la realización 1, en la que el tensioactivo o polietilenglicol de alto peso molecular es PEG 3350.

13. La composición de la realización 12, en la que la concentración de PEG 3350 es del 0,1% (p/v).

14. La composición de la realización 1, en la que el pH es 6,0.

20 15. La composición de la realización 1, en la que el tampón se selecciona del grupo que consiste en tampones de histidina, citrato, fosfato, Tris y succinato.

16. La composición de la realización 1, en la que el tampón es tampón de histidina.

17. La composición de la realización 16, en la que la concentración del tampón de histidina es de 2,0-10 mM.

18. La composición de la realización 1, en la que el tampón es histidina 5 mM a pH 6,0.

19. La composición de trombina de la realización 1, que consiste esencialmente en:

25 de 0,1 mg/ml a 5,0 mg/ml de trombina;  
de un 2% a un 4% (p/v) de sacarosa;  
de un 3,5% a un 5% (p/v) de manitol;  
NaCl de 100 mM a 200 mM;  
CaCl<sub>2</sub> de 1 mM a 5 mM;  
30 de un 0,03% a un 1% (p/v) de PEG3350; e  
histidina de 2 mM a 10 mM

en solución acuosa a un pH de 5,5 – 6,5, en la que la relación de manitol:sacarosa es mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1 (p/p).

20. La composición de trombina de la realización 19, que consiste esencialmente en:

35 1 mg/ml de trombina;  
un 3% (p/v) de sacarosa;  
un 4% (p/v) de manitol;  
CaCl<sub>2</sub> 4 mM;  
40 un 0,1% (p/v) de PEG3350;  
NaCl 150 mM; e  
histidina 5 mM

en solución acuosa a un pH de 6,0.

21. Un procedimiento para preparar una composición de trombina liofilizada que comprende:

45 proporcionar una composición de acuerdo con la realización 1; y  
liofilizar la solución acuosa para formar una composición de trombina liofilizada.

22. El procedimiento de la realización 21 en el que, dentro de la etapa de proporcionar una composición de acuerdo con la realización 1, la composición consiste esencialmente en:

- 5 de 0,1 mg/ml a 5,0 mg/ml de trombina;  
de un 2% a un 4% (p/v) de sacarosa;  
de un 3,5% a un 5% (p/v) de manitol;  
NaCl de 100 mM a 200 mM;  
CaCl<sub>2</sub> de 1 mM a 5 mM;  
de un 0,03% a un 1% (p/v) de PEG3350; e  
10 histidina de 2 mM a 10 mM  
en una solución acuosa a un pH de 5,5 – 6,5, en la que la relación de manitol:sacarosa es mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1 (p/p).

23. Una composición de trombina liofilizada preparada por el procedimiento de la realización 21.

24. La composición de la realización 23 contenida en un recipiente sellado que tiene una etiqueta pegada a la superficie exterior del mismo.

- 15 25. La composición de la realización 24, que contiene de 2.500 a 20.000 Unidades NIH de trombina.

26. Un kit que comprende la composición de la realización 24 y un segundo recipiente sellado que contiene un diluyente.

27. El kit de la realización 26 en el que el diluyente es solución salina normal.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición liofilizada preparada a partir de una solución que consiste esencialmente en trombina recombinante humana, sacarosa, manitol, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, un tensioactivo o polietilenglicol de alto peso molecular, y un tampón fisiológicamente aceptable,  
 5 en la que la concentración de dicha trombina recombinante humana en dicha solución es de 0,1 mg/ml a 5,0 mg/ml; la concentración de dicha sacarosa en dicha solución es del 2% al 4% (p/v); la concentración de dicho manitol en dicha solución es del 3,5% al 5% (p/v); la concentración de dicho NaCl en dicha solución es de 50 mM a 300 mM; la concentración de dicho CaCl<sub>2</sub> en dicha solución es de 0 mM a 5 mM; y  
 10 la concentración de dicho tensioactivo o polietilenglicol de alto peso molecular en dicha solución es del 0,03% al 1% (p/v), en la que dicha solución tiene un pH de 5,7 a 7,4 y proporciona un pH aproximadamente fisiológico tras la aplicación de la composición en un entorno quirúrgico, y en la que dicha solución tiene una relación de manitol:sacarosa que es mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1 (p/p).
- 15 2. Una composición liofilizada preparada a partir de una solución que consiste esencialmente en trombina recombinante humana, sacarosa, manitol, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, PEG 3350 y un tampón de histidina, en la que la concentración de dicha trombina recombinante humana en dicha solución es de 0,1 mg/ml a 5,0 mg/ml; la concentración de dicha sacarosa en dicha solución es del 2% al 4% (p/v); la concentración de dicho manitol en dicha solución es del 3,5% al 5% (p/v);  
 20 la concentración de dicho NaCl en dicha solución es de 100 mM a 200 mM; la concentración de dicho CaCl<sub>2</sub> en dicha solución es de 1 mM a 5 mM; la concentración de dicho PEG 3350 en dicha solución es del 0,03% al 1% (p/v); y la concentración de dicha histidina en dicha solución es de 2 mM a 10 mM; en la que dicha solución tiene un pH de 5,5 a 6,5 y proporciona un pH aproximadamente fisiológico tras la aplicación  
 25 de la composición en un entorno quirúrgico, y en la que dicha solución tiene una relación de manitol:sacarosa que es mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1 (p/p).
3. Una composición liofilizada de acuerdo con la reivindicación 2 preparada a partir de una solución a un pH de 6,0 que comprende 1 mg/ml de trombina recombinante humana en histidina 5 mM, un 2% de sacarosa, un 5% de manitol, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM y un 0,1% de PEG 3350.
- 30 4. Una composición liofilizada de acuerdo con la reivindicación 2 preparada a partir de una solución a un pH de 6,0 que comprende 1 mg/ml de trombina recombinante humana en histidina 5 mM, un 3% de sacarosa, un 5% de manitol, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM y un 0,1% de PEG 3350.
5. Una composición liofilizada de acuerdo con la reivindicación 2 preparada a partir de una solución a un pH de 6,0 que comprende 1 mg/ml de trombina recombinante humana en histidina 5 mM, un 3% de sacarosa, un 4% de  
 35 manitol, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM y un 0,1% de PEG 3350.
6. La composición liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en la que dicha relación entre manitol y sacarosa es 1,33:1 (p/p).
7. La composición liofilizada de cualquier reivindicación precedente en la que dicha solución tiene una relación molar de sacarosa:trombina que es al menos de 700:1.
- 40 8. La composición liofilizada de cualquier reivindicación precedente en la que dicha solución tiene una relación molar de sacarosa:trombina que es al menos de 2000:1.
9. La composición liofilizada de la reivindicación 1 o 2, en la que dicha solución tiene una concentración de trombina recombinante humana que es de 0,5 a 3,0 mg/ml.
- 45 10. La composición liofilizada de la reivindicación 1 o 2, en la que dicha solución tiene una concentración de trombina recombinante humana que es de 1 mg/ml.
11. La composición liofilizada de la reivindicación 1 o 2, en la que dicha solución tiene una concentración de sacarosa que es del 3% (p/v).
12. La composición liofilizada de la reivindicación 1 o 2, en la que dicha solución tiene una concentración de manitol que es del 4% (p/v).
- 50 13. La composición liofilizada de la reivindicación 1 o 2, en la que dicha solución tiene una concentración de sacarosa que es del 3% (p/v) y una concentración de manitol que es del 4% (p/v).
14. La composición liofilizada de la reivindicación 1 o 2, en la que dicha solución tiene una concentración de PEG 3350 que es del 0,1% (p/v).
15. La composición liofilizada de la reivindicación 1 o 2, en la que el pH de dicha solución es 6,0.

16. La composición liofilizada de la reivindicación 1, en la que dicho tampón fisiológicamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en tampones de histidina, citrato, fosfato, Tris y succinato.
17. La composición liofilizada de la reivindicación 1, en la que dicho tampón fisiológicamente aceptable es un tampón de histidina.
- 5 18. La composición liofilizada de la reivindicación 17, en la que dicha concentración de tampón de histidina en dicha solución es de 2,0 a 10 mM.
19. La composición liofilizada de la reivindicación 1, en la que dicho tampón fisiológicamente aceptable en dicha solución es histidina 5 mM a un pH de 6,0.
- 10 20. Un kit que comprende un recipiente sellado que contiene dicha composición liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
21. Un kit de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el recipiente sellado contiene de 2500 unidades NIH a 20000 unidades NIH de trombina recombinante humana.
22. El kit de la reivindicación 20 o 21 que además comprende un segundo recipiente sellado que contiene un diluyente.
- 15 23. El kit de la reivindicación 22, en el que dicho diluyente es solución salina normal.
24. El uso de una composición en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un tejido sangrante, en el que dicha composición se prepara en una solución acuosa que consiste esencialmente en: trombina, sacarosa, manitol, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, un tensioactivo o polietilenglicol de alto peso molecular, y un tampón fisiológicamente aceptable,
- 20 en la que la concentración de dicha trombina en dicha solución es de 0,1 mg/ml a 5,0 mg/ml;  
la concentración de dicha sacarosa en dicha solución es del 2% al 4% (p/v);  
la concentración de dicho manitol en dicha solución es del 3,5% al 5% (p/v);  
la concentración de dicho NaCl en dicha solución es de 50 mM a 300 mM;  
la concentración de dicho CaCl<sub>2</sub> en dicha solución es de 0 mM a 5 mM; y
- 25 la concentración de dicho tensioactivo o polietilenglicol de alto peso molecular en dicha solución es del 0,03% al 1% (p/v),  
en la que dicha solución tiene un pH de 5,7 a 7,4 y proporciona un pH aproximadamente fisiológico tras la aplicación de la composición en un entorno quirúrgico, y en la que dicha solución tiene una relación de manitol:sacarosa que es mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1 (p/p): y
- 30 en la que la preparación del medicamento incluye las etapas de liofilizar la solución acuosa para formar una composición de trombina liofilizada y reconstituir la composición de trombina liofilizada con un diluyente adecuado.
25. Uso de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el medicamento comprende un adhesivo de tejidos o pegamento de fibrina.
- 35 26. Uso de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el tratamiento de un tejido sangrante comprende el uso de una esponja de gelatina absorbible.
27. Uso de acuerdo con la reivindicación 24, en el que la composición reconstituida de trombina comprende trombina a 100 U NIH/ml a 5000 U NIH/ml.
- 40 28. La composición liofilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 – 19 para su uso en un procedimiento para conseguir la hemostasia, en la que el procedimiento incluye la reconstitución de la composición con un diluyente adecuado y su aplicación en un tejido sangrante.
29. Una composición de acuerdo con la reivindicación 28, en la que la aplicación en el tejido sangrante es en combinación con una esponja de gelatina absorbible.
30. Una composición de acuerdo con la reivindicación 28, en la que la composición es un componente de un adhesivo de tejidos o un pegamento de fibrina.
- 45 31. Una composición de acuerdo con la reivindicación 28, en la que la composición de trombina reconstituida comprende trombina de 100 U NIH/ml a 5000 U NIH/ml.

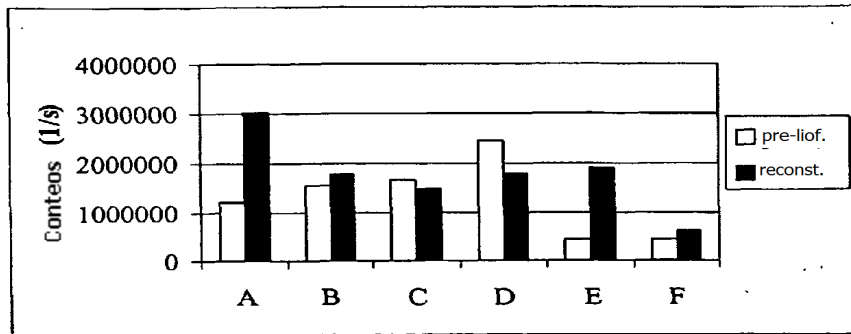


Fig. 1

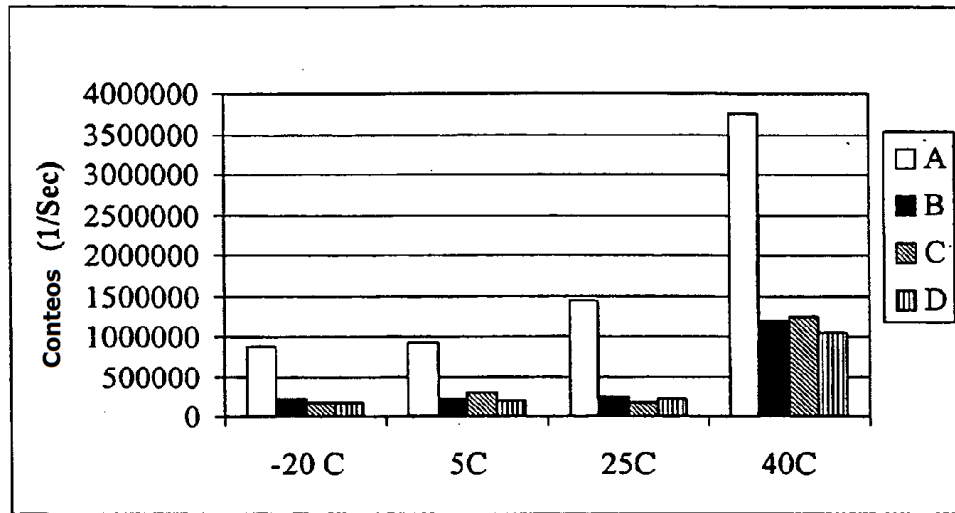


Fig. 2

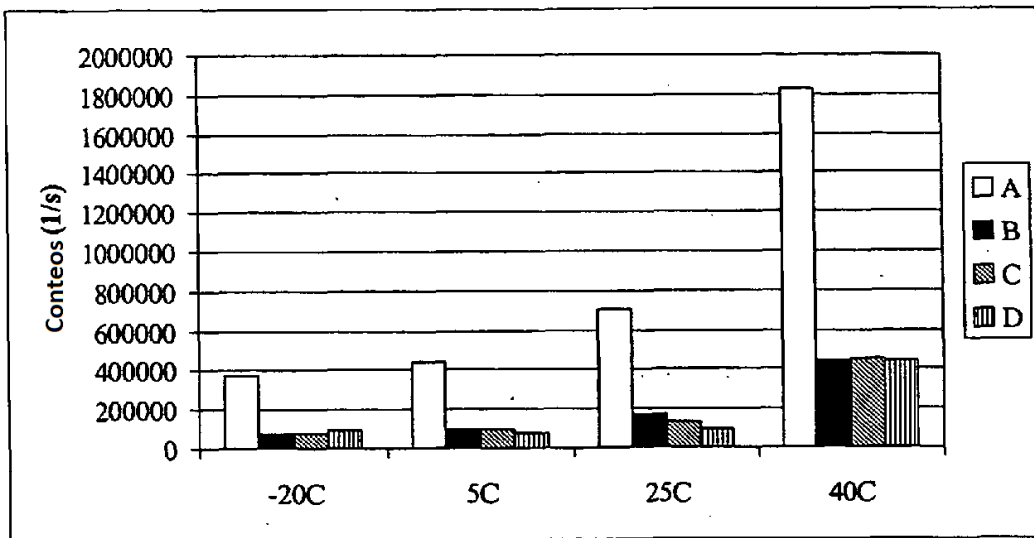


Fig. 3



Fig. 4

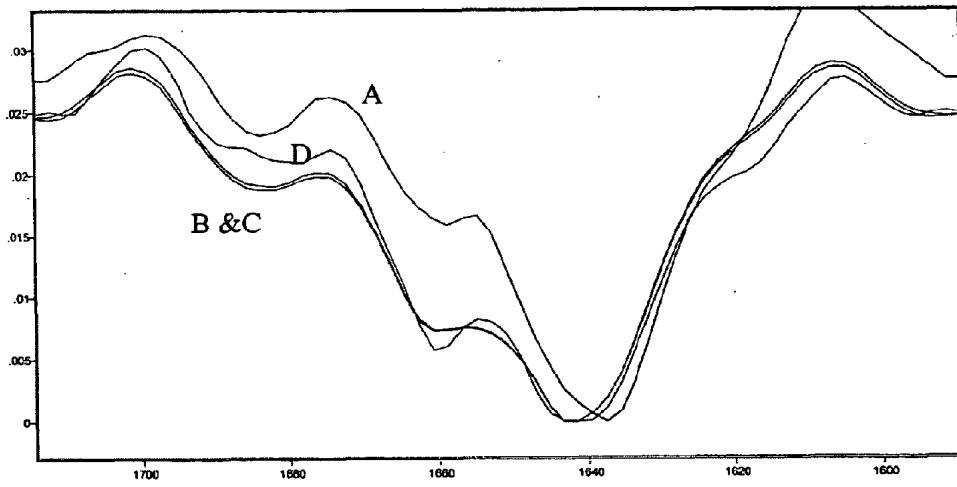


Fig. 5

