

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 234**

51 Int. Cl.:

A61K 9/08

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2008** **E 08780809 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2012** **EP 2167041**

54 Título: **Composiciones estabilizadas de trombina**

30 Prioridad:

15.06.2007 US 944224 P

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

05.03.2013

73 Titular/es:

**ZYMOGENETICS, INC. (100.0%)
1201 Eastlake Avenue East
Seattle, WA 98102, US**

72 Inventor/es:

**SENDEROFF, RICHARD, I. y
JIANG, SHAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 397 234 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 estabilizadas de trombina.

Antecedentes de la invención

- 5 La formulación de proteínas farmacéuticas presenta retos significativos. Las proteínas tienen múltiples grupos funcionales además de una estructura tridimensional; por lo tanto la degradación procede mediante vías químicas (modificaciones que implican la formación o escisión de enlaces) y físicas (desnaturalización, agregación, adsorción, precipitación). Como cada proteína implica una combinación única de secuencia de aminoácidos, punto isoeléctrico, y otros determinantes, su respuesta a cambios en condiciones de solución es impredecible, y debe determinarse en una base caso por caso. Intentos por evitar una forma de degradación a menudo aumentan la tasa de otra.
- 10 La degradación de proteínas puede reducirse enormemente o evitarse por liofilización. Sin embargo, la liofilización lleva mucho tiempo y es muy costosa, y puede causar la desnaturalización y agregación de la proteína si no se incluyen los excipientes apropiados. Como con formulación en solución, la estabilización de las proteínas liofilizadas debe afrontarse en una base individual. Puede usarse cloruro sódico para mantener la estabilidad durante la purificación y el almacenamiento reduciendo la agregación y la precipitación. Sin embargo, el cloruro sódico es un
- 15 excipiente problemático en formulaciones liofilizadas porque disminuye la temperatura de transición vítrea, necesitando de este modo temperaturas principales bajas y tiempos largos de ciclo. Jiang y col., documento US 20060002918 A1 describen procedimientos para estabilizar preparaciones de trombina liofilizadas formulando la trombina con sacarosa, manitol, cloruro sódico y un tensioactivo o polietilenglicol de alto peso molecular. Sin embargo, la estabilización de una proteína en estado liofilizado no asegura la estabilidad después de su reconstitución, y las soluciones de proteína a menudo deben desecharse si no se usan inmediatamente después de su reconstitución. Además, la manipulación en uso de un producto de fármaco liofilizado a menudo está limitada por consideraciones de esterilidad porque la integridad del cierre del recipiente se compromete durante la reconstitución. Por tanto, el tiempo de manipulación en uso podría prolongarse si una formulación de producto de fármaco fuera estable en presencia de un conservante.
- 20 En vista del coste a menudo elevado de los agentes terapéuticos proteicos, se necesitan medios para potenciar la estabilidad de estas proteínas en solución. En el caso de trombina, se han propuesto diversos excipientes para estabilizar la proteína. Por ejemplo, Silbering y col., patente de Estados Unidos N° 4.696.812 describe el uso de niveles bajos de solución salina y glicerol para reducir la desnaturalización de la trombina en solución. Nishimaki y col., patente de Estados Unidos N° 5.130.244 describe una solución acuosa de trombina que contiene un azúcar y
- 25 un aminoácido como estabilizantes.

A pesar de estos avances, sigue existiendo la necesidad en la técnica de preparaciones de trombina que pueden almacenarse durante periodos prolongados de tiempo en forma líquida.

Sumario de la invención

- 35 La presente invención proporciona composiciones estables en almacenamiento de trombina de acuerdo con la reivindicación 1 y procedimientos y kits relacionados. Las trombinas para su uso en la invención incluyen, sin limitación, trombina humana, trombina humana recombinante, y trombina bovina.

- 40 En un aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende trombina, una cantidad bacteriostáticamente eficaz de un conservante seleccionado entre el grupo compuesto por alcohol bencílico y clorobutanol, y del 0,10 % al 5,0 % (p/v) de sacarosa en solución acuosa. En ciertas realizaciones, la composición comprende adicionalmente uno o más de un tampón, una sal, un poliol, un tensioactivo, un aminoácido, o un carbohidrato adicional. En otra realización, el conservante es alcohol bencílico. En una realización relacionada, el conservante es alcohol bencílico a una concentración del 0,8 % - 1,5 %, v/v. En otra realización, la composición comprende adicionalmente manitol. En una realización relacionada, el manitol y la sacarosa están presentes en la composición a una proporción manitol:sacarosa mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1 (p/p).
- 45 En un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende trombina, un tampón farmacéuticamente aceptable, del 0,10 % al 5 % (p/v) de sacarosa, y un conservante seleccionado entre el grupo compuesto por alcohol bencílico a una concentración del 0,8 % al 1,5 % (v/v) o clorobutanol a una concentración del 0,4 % al 0,6 % (p/v), en solución acuosa a pH 5,7 - 7,4. En una realización, el conservante es alcohol bencílico. En una realización relacionada, el conservante es alcohol bencílico a una concentración del 0,8 % - 1,0 %, v/v. En otras realizaciones, la concentración de sacarosa es del 0,5 % al 3,0 % (p/v) o aproximadamente el 1 % (p/v). En otras realizaciones, el tampón se selecciona entre el grupo compuesto por los tampones histidina, citrato, fosfato, Tris, succinato, y acetato. En otra realización, la composición comprende adicionalmente manitol. En una realización relacionada, el manitol y la sacarosa están presentes en la composición a una proporción de manitol:sacarosa mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1 (p/p). En otra realización, el diluyente comprende cloruro sódico. En realizaciones
- 50 adicionales, la trombina está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5,0 mg/ml o una concentración de 0,3 mg/ml a 3,0 mg/ml.

En un tercer aspecto de la invención se proporciona una composición acuosa que consta esencialmente de 0,03 mg/ml a 1,6 mg/ml de trombina, del 0,17 % al 1,3 % (p/v) de sacarosa, del 1,1 % al 1,6 % (p/v) de manitol, del 0,8 % al 2,0 % (p/v) de NaCl, CaCl_2 0 - 1,6 mM, del 0,001 % al 0,32 % (p/v) de un tensioactivo o polietilenglicol de alto peso molecular, un tampón farmacéuticamente aceptable, y una cantidad bacteriostáticamente eficaz de un conservante seleccionado entre el grupo compuesto por alcohol bencílico y clorobutanol en solución acuosa a pH 5,7 - 7,4. La concentración del tampón se selecciona para proporcionar un pH aproximadamente fisiológico tras la aplicación de la composición en un entorno quirúrgico, y la proporción de manitol:sacarosa es mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1 (p/p). En una realización, la proporción de manitol a sacarosa es 1,33:1 (p/p). En otras realizaciones, la proporción molar de sacarosa:trombina es de al menos 700:1 o al menos 2.000:1. En otra realización, el conservante es alcohol bencílico a una concentración del 0,8 % al 1,5 % (v/v).

En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para preparar una solución estabilizada de trombina que comprende las etapas de (a) proporcionar una composición liofilizada que comprende trombina y una cantidad de sacarosa suficiente para estabilizar la proteína en presencia de una cantidad bacteriostáticamente eficaz de un conservante seleccionado entre el grupo compuesto por alcohol bencílico y clorobutanol, (b) proporcionar un diluyente que comprende una cantidad bacteriostáticamente eficaz de alcohol bencílico o clorobutanol en agua, y (c) combinar la composición liofilizada y el diluyente para formar una solución, en la que la concentración de sacarosa en la solución es del 0,10 % al 5,0 % (p/v). En ciertas realizaciones, la composición liofilizada comprende adicionalmente un tampón, una sal, o un poliol.

En un quinto aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para preparar una solución estabilizada de trombina que comprende las etapas de (a) proporcionar una composición liofilizada que comprende trombina y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, y (b) reconstituir la composición liofilizada en un diluyente para proporcionar una solución de trombina farmacéuticamente aceptable, en la que el diluyente se selecciona para proporcionar en la solución una concentración de alcohol bencílico del 0,8 % al 1,5 % (v/v) y una concentración de sacarosa del 0,10 % al 5 % (p/v). En una realización, la solución comprende adicionalmente manitol. En una realización relacionada, la solución comprende manitol y el manitol y la sacarosa están presentes en la solución a una proporción de manitol:sacarosa mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1 (p/p).

En un sexto aspecto de la invención se proporciona un kit que comprende (a) un diluyente farmacéuticamente aceptable que comprende una cantidad bacteriostáticamente eficaz de alcohol bencílico o clorobutanol en agua en un primer recipiente sellado, y (b) una composición liofilizada que comprende trombina y una cantidad de sacarosa en un segundo recipiente sellado, en la que la cantidad de sacarosa se selecciona para proporcionar una concentración de sacarosa del 0,10 % al 5,0 % (p/v) tras la reconstitución de la composición liofilizada con el diluyente. En una realización, el diluyente comprende adicionalmente NaCl. En una realización relacionada, el diluyente es solución salina bacteriostática. En otra realización, el kit comprende adicionalmente un medio para transferir el diluyente del primer recipiente sellado al segundo recipiente sellado. En realizaciones adicionales, el kit comprende una hoja de instrucciones y/o un dispositivo de aplicación, tal como una jeringa o pulverizador. En una realización adicional, el primer y segundo recipientes sellados están envasados en un tercer recipiente.

En un séptimo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para administrar trombina a un mamífero que lo necesite, que comprende las etapas de (a) proporcionar un diluyente farmacéuticamente aceptable que comprende una cantidad bacteriostáticamente eficaz de un conservante seleccionado de entre el grupo compuesto por alcohol bencílico y clorobutanol, (b) proporcionar una composición liofilizada que comprende trombina y una cantidad de sacarosa, (c) reconstituir la composición liofilizada con el diluyente para formar una solución, y (d) suministrar la solución al mamífero, en la que la cantidad de sacarosa se selecciona para proporcionar una concentración de sacarosa del 0,10 % al 5,0 % (p/v) tras la reconstitución de la composición liofilizada con el diluyente. En una realización, el diluyente es solución salina bacteriostática.

Estos y otros aspectos de la invención llegarán a ser evidentes tras la referencia a la siguiente descripción de la invención.

Descripción de la invención

"Solución salina bacteriostática" es cloruro sódico al 0,9 % en agua (solución salina normal) que contiene alcohol bencílico al 0,9 % como conservante.

Una "cantidad bacteriostáticamente eficaz de un conservante" es una cantidad que proporciona un efecto bacteriostático de acuerdo con los criterios de la USP 51, que es una cantidad suficiente para proteger a una forma de dosificación de un agente terapéutico del crecimiento microbiano o de microorganismos que se introducen de forma inadvertida durante o después de la fabricación. Un intervalo bacteriostático típico para el alcohol bencílico es del 0,9 - 2,0 % (v/v), aunque pueden usarse cantidades de hasta el 5 % en ciertas aplicaciones. Un intervalo bacteriostático típico para clorobutanol es del 0,4 % al 0,6 % (p/v). Los especialistas en la técnica reconocerán que la concentración requerida de un conservante variará algo con la composición de la solución; los excipientes farmacéuticos comunes pueden aumentar o disminuir la actividad bacteriostática. La concentración real requerida para cualquier solución puede determinarse de acuerdo con procedimientos convencionales de ensayo.

Como se usa en este documento, un "diluyente" es una solución que diluye o hace que sea menos potente un agente terapéutico. El término se usa para incluir soluciones que se usan para reconstituir agentes terapéuticos en polvo (por ejemplo, liofilizados). Un "diluyente farmacéuticamente aceptable" es un diluyente que está en la lista GRAS (del inglés "generally recognized as safe", generalmente reconocida como segura) reconocida por los cuerpos reguladores farmacéuticos. Diluyentes farmacéuticamente aceptables habitualmente usados incluyen agua USP estéril, solución salina USP normal, y dextrosa USP al 5 %.

Como se usa en este documento, "trombina" indica la encima activada, también conocida como α -trombina, que es el resultado de la escisión proteolítica de la protrombina (factor II). Como se describe a continuación, la trombina puede prepararse por una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, y el término "trombina" no pretende implicar un procedimiento particular de producción. La trombina humana es una proteína de 295 aminoácidos compuesta por dos cadenas polipeptídicas unidas por un enlace disulfuro. Pueden usarse trombinas tanto humanas como no humanas (por ejemplo, bovinas) en la presente invención. La trombina se usa de forma médica como agente hemostático y como componente de adhesivos tisulares.

Las trombinas humanas y no humanas se preparan de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. La purificación de la trombina a partir de plasma se describe, por ejemplo, por Bui-Khac y col., patente de Estados Unidos Nº 5.981.254. La purificación de la trombina a partir de fracciones plasmáticas, tal como la fracción III de Cohn, se describe 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 describe en la patente de Estados Unidos Nº 5.476.777. Los activadores de veneno adecuados incluyen ecarina y activador de protrombina de *Oxyuranus scutellatus*. También pueden emplearse otros activadores, tales como el factor Xa.

La trombina altamente purificada tiene una actividad específica de aproximadamente 3.200 Unidades NIH por mg o 3.800 Unidades Internacionales por mg. Una Unidad NIH equivale a 1,19 Unidades Internacionales. La abreviatura "U" se usa en este documento para indicar "Unidades" e indica unidades NIH salvo que se especifique otra cosa. La abreviatura "UI" se usa para indicar Unidades Internacionales.

Los intervalos numéricos (por ejemplo, "de X a Y") incluyen los puntos finales salvo que se especifique otra cosa.

Los términos "alrededor de" y "aproximadamente" indican un intervalo de error de $\pm$ el 10 % de error indicado. Por ejemplo, "aproximadamente el 1 %" se usa para indicar un intervalo del 0,9 % al 1,1 %, inclusive.

Todas las referencias citadas en este documento se incorporan por referencia en su totalidad.

La presente invención proporciona procedimientos para estabilizar la trombina en solución. Los inventores han descubierto que una formulación liofilizada previamente descrita (Jiang y col., documento US 20060002918 A1) de trombina humana recombinante, cuando se reconstituye con solución salina bacteriostática, permanece estable a temperatura de nevera durante hasta trece semanas. Este resultado fue inesperado en vista de la tendencia conocida de los conservantes tales como el alcohol bencílico a desnaturalizar las proteínas y aumentar las tasas de agregación (por ejemplo, Gupta y Kaisheva, AAPS PharmSci 5(2):E8, 2003; Maa y Hsu, Int. J. Pharm. 140:155-168, 1996; Lam y col., Pharm. Res. 14:725-729, 1997). Cuando se reconstituyó una preparación de trombina bovina (THROMBIN-JMI, King Pharmaceuticals, Inc.) con solución salina bacteriostática, la solución se volvió turbia. Se descubrió que la turbidez de la última preparación podía evitarse añadiendo sacarosa al diluyente usado para reconstituirla.

Las composiciones de la presente invención comprenden, en solución acuosa, trombina, una cantidad bacteriostáticamente eficaz de un conservante seleccionado entre el grupo compuesto por alcohol bencílico y clorobutanol, y sacarosa para estabilizar la trombina frente a la degradación inducida por el conservante. La concentración de sacarosa en la composición es del 0,10 % al 5,0 % (p/v), a menudo del 0,17 % al 5,0 %, habitualmente del 0,17 % al 3,0 %, más habitualmente del 0,5 % al 2,0 %. En ciertas realizaciones de la invención, la concentración de sacarosa es del 1 % (p/v). Las composiciones de trombina son estables a temperaturas de nevera durante al menos cuatro semanas. Se ha descubierto que las soluciones de trombina humana recombinante de este tipo permanecen estables cuando se ensayan después de seis y trece semanas de almacenamiento a 2 °C - 8 °C.

Como será evidente para los especialistas en la técnica, las composiciones pueden comprender componentes adicionales, tales como tampones, agentes de volumen, lioprotectores, solubilizantes, tensioactivos, carbohidratos, polioles, aminoácidos, carbohidratos adicionales (por ejemplo, trehalosa), y/o agentes para ajustar la tonicidad (por ejemplo, sales, manitol). La selección de los componentes reales es una materia de elección de diseño rutinaria y pertenece a las habilidades de los especialistas en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 21ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2005.

La trombina se proporciona habitualmente en forma de un polvo o torta liofilizada que puede reconstituirse añadiendo un diluyente farmacéuticamente aceptable y mezclando. El diluyente habitualmente contendrá el conservante (por ejemplo, alcohol bencílico o clorobutanol). El volumen de diluyente se selecciona para proporcionar una solución que tenga una concentración final de sacarosa del 0,10 % al 5,0 % (p/v). La sacarosa puede estar presente en la formulación liofilizada de trombina, el diluyente, o ambos, siempre que la concentración total de

sacarosa en la solución reconstituida esté dentro del intervalo del 0,10 % al 5,0 %, del 0,17 % al 5,0 %, del 0,17 % al 3,0 %, o del 0,5 % al 2,0 % (p/v). La formulación liofilizada también puede contener un tampón como se describe a continuación en más detalle. En una realización, la formulación contiene manitol como agente de volumen. En formulaciones preferidas, el manitol se incluye a una proporción de manitol:sacarosa mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1 (p/p). La selección real del diluyente se hará en vista de la composición de la formulación liofilizada y el uso pretendido del producto. Sin embargo, la invención no se limita por el modo en que se prepara la composición o el orden en que se combinan sus constituyentes. Por ejemplo, una formulación liofilizada de trombina que contenga uno o más lioprotectores puede reconstituirse con un diluyente farmacéuticamente aceptable que contenga el conservante y sacarosa, y que contenga opcionalmente componentes adicionales como se ha descrito anteriormente. Si no se requiere almacenamiento a largo plazo o se aumenta la estabilidad por almacenamiento a temperaturas por debajo de la congelación (<0 °C), la trombina purificada puede formularse con el conservante, la sacarosa, y opcionalmente otros componentes, sin preparar una formulación liofilizada.

Puede emplearse cualquier tampón farmacéuticamente aceptable dentro de la presente invención. Se prefiere seleccionar un tampón que proporcione un pH de ligeramente ácido a aproximadamente neutro para limitar la pérdida de actividad trombina debido a autólisis (formación de productos inactivos de la degradación autolítica incluyendo β - y γ -trombina), que aumenta por encima de pH 6,0, y precipitación, que aumenta por debajo de pH 6,0. Por lo tanto es ventajoso usar un tampón débil que sea eficaz a pH de ligeramente ácido a aproximadamente neutro (es decir, pH 5,7-7,4), pero que permita que el pH alcance el pH fisiológico (es decir, pH 7,35-7,45) cuando se aplica la trombina a tejido sangrante, proporcionando de este modo una actividad biológica óptima. Se prefieren composiciones de trombina tamponadas a un pH de 6,0-6,5. Los ejemplos de tampones adecuados incluyen tampones histidina, fosfato, citrato, Tris (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol), y succinato. Por ejemplo, puede incluirse tampón histidina a una concentración de 1-20 mM, habitualmente 2-10 mM, y más a menudo de aproximadamente 5 mM.

Las concentraciones adecuadas de otros tampones para su uso dentro de la presente invención pueden determinarlas fácilmente los especialistas en la técnica. Los tampones de formulación pueden ensayarse añadiendo sangre y midiendo el pH de la solución resultante. En un ensayo ejemplar, se añaden alícuotas de sangre de conejo por etapas a diversos tampones, y se mide el pH después de cada adición. Cuando se ensayan tampones histidina 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 volumen de sangre. En contraste, el tampón succinato 160 mM y el tampón fosfato 90 mM/histidina 12,8 mM no produjeron una mezcla con un pH por encima de 7,0 incluso después de la adición de 2-3 volúmenes de sangre. Por tanto, cuando se usan tampones tales como succinato o fosfato/histidina, se prefieren concentraciones inferiores.

Las composiciones típicas de trombina dentro de la presente invención constan esencialmente de 0,03 mg/ml a 1,6 mg/ml de trombina, del 0,17 % al 1,3 % (p/v) de sacarosa, una cantidad bacteriostáticamente eficaz de alcohol bencílico o clorobutanol, del 1,1 % al 1,6 % (p/v) de manitol, del 0,8 % al 2,0 % (p/v) de NaCl, CaCl_2 0-1,6 mM, del 0,001 % al 0,32 % (p/v) de un tensioactivo (por ejemplo, óxidos de polietileno, ésteres de sorbitán, polioxietilen alquil éteres, glicéridos de ácidos grasos, o ésteres de ácidos grasos de polioxietilen sorbitán) o polietilenglicol de alto peso molecular (por ejemplo, PEG 400, PEG 1000, PEG 3350, PEG 5000, o PEG 8000), y un tampón farmacéuticamente aceptable a pH 5,7 - 7,4. En ciertas composiciones preferidas, la proporción de manitol:sacarosa es mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1 (p/p).

La concentración de trombina dentro de las composiciones de la presente invención puede variarse, dependiendo del uso pretendido, ajustando el volumen de dilución. Para aplicación tópica para controlar una hemorragia, la concentración trombina será generalmente de aproximadamente 100 U/ml a aproximadamente 20.000 U/ml (aproximadamente de 0,026 mg de α -trombina, por ml a 5,26 mg de α -trombina, por ml), más habitualmente de aproximadamente 300 U/ml a aproximadamente 5.000 U/ml, normalmente aproximadamente 1.000 U/ml, aunque la concentración real la determinarán los médicos de acuerdo con las necesidades el paciente individual. La solución de trombina puede usarse inmediatamente, mantenerse a temperatura ambiente durante hasta 48 horas, o almacenarse en refrigeración durante hasta cuatro semanas o más. La trombina puede aplicarse a un tejido sangrante para conseguir hemostasis, a menudo en combinación con una esponja de gelatina absorbible u otro vehículo de suministro de acuerdo con la práctica quirúrgica convencional. La trombina también puede usarse como componente de un adhesivo tisular o pegamento de fibrina. Estos y otros usos de la trombina son conocidos en la técnica.

La invención proporciona adicionalmente trombina en un kit que comprenden un diluyente en un primer recipiente sellado y trombina liofilizada en un segundo recipiente sellado. El diluyente comprende una cantidad bacteriostáticamente eficaz de alcohol bencílico o clorobutanol. En realizaciones típicas, el diluyente es solución salina normal (solución de cloruro sódico al 0,9 % p/v) que contiene el alcohol bencílico o clorobutanol. El kit puede comprender adicionalmente un dispositivo de aplicación, tal como un pulverizador, jeringa, o similares, así como una o más agujas u otros dispositivos de transferencia para facilitar la transferencia de líquido dentro y fuera de los recipientes. Se conoce en la técnica una diversidad de dichos dispositivos, incluyendo dispositivos de transferencia sin aguja. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 6.558.365. También puede envasarse una hoja de instrucciones en el kit. Habitualmente, el primer y segundo recipientes se envasarán en un tercer recipiente. Los contenidos del kit habitualmente estarán estériles. El tercer recipiente también puede estar estéril.

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

Ejemplos

Ejemplo 1

- 5 Se formuló trombina humana recombinante (rhTrombina) a 1 mg/ml (3200 U/ml) en histidina 5 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 4 mM, PEG3350 al 0,1 %, pH 6,0 con concentraciones variables de manitol y sacarosa como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

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

- 10 Se colocaron alícuotas de 1,6 ml de las soluciones en viales y se liofilizaron en las condiciones mostradas en la Tabla 2. Para el posterior análisis, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con agua cuando fue necesario. Las observaciones visuales de muestras liofilizadas y reconstituidas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 2

Formulación	Congelación y atemperado	Secado principal	Secado secundario
T	0,5 °C/min a 5 °C, mant. 0,5 h 0,25 °C/min a -50 °C, mant. 2 h 0,25 °C/min a -30 °C, mant. 3 h 0,25 °C/min a -50 °C, mant. 2 h	0,5 °C/min a -10 °C, mant. 16 h 7,98 Pa (60 mTorr)	0,2 °C/min a 30 °C, mant. 24 h 7,98 Pa (60 mTorr)
A, B, C, D, E, F	0,5 °C/min a 5 °C, mant. 2 h 0,5 °C/min a -50 °C, mant. 2 h 0,25 °C/min a -20 °C, mant. 2 h 0,25 °C/min a -25 °C, mant. 2 h 0,25 °C/min a -50 °C, mant. 2 h	0,5 °C/min a -30 °C, mant. 10 h 0,5 °C/min a -25 °C, mant. 10 h 0,5 °C/min a -20 °C, mant. 10 h 0,5 °C/min a -15 °C, mant. 10 h 7,98 Pa (60 mTorr)	0,5 °C/min a 25 °C, mant. 24 h 0,5 °C/min a 30 °C, mant. 8 h 0,5 °C/min a 20 °C, mant. 6 h 7,98 Pa (60 mTorr)

Tabla 3

Formulación	Sólido liofilizado	Solución reconstituida
T	Torta blanca	Transparente
A	Torta blanca	Transparente
B	Torta blanca	Transparente
C	Torta blanca	Transparente
D	Torta blanca	Transparente
E	Torta blanca semi-hundida o polvo blanco	Transparente
F	Polvo blanco	Transparente

15

Ejemplo 2

Se formuló trombina humana recombinante a 1 mg/ml en histidina 5 mM, sacarosa al 3 % (p/v), manitol al 4 % (p/v), NaCl 150 mM, CaCl₂ 4 mM, PEG3350 al 0,1 %, pH 6,0. Se colocaron alícuotas de 1,6 ml de la solución en viales y se liofilizaron en las condiciones mostradas en la Tabla 4.

Tabla 4

Congelación y atemperado	Secado principal	Secado secundario
0,5 °C/min a 5 °C, mant. 2 h 0,25 °C/min a -52 °C, mant. 4 h 0,5 °C/min a -25 °C, mant. 2 h 0,5 °C/min a -52 °C, mant. 4 h	0,5 °C/min a -10 °C, mant. 26 h; 7,98 Pa (60 mTorr)	0,5 °C/min a 30 °C, mant. 24 h; 7,98 Pa (60 mTorr)

Ejemplo 3

Se reconstituyeron un vial (5.000 UI) cada uno de trombina humana recombinante ("rhTrombina DP," preparada como se ha descrito en el Ejemplo 2) y trombina bovina (THROMBIN-JMI, Jones Pharma Incorporated, Bristol, VA; polvo liofilizado que contiene manitol y cloruro sódico) con 5 ml de solución salina bacteriostática USP. La trombina bovina apareció incolora, turbia y espumosa después de la reconstitución, mientras que la trombina recombinante fue incolora y transparente. Después de almacenamiento a 25 °C durante 48 horas, la trombina bovina fue incolora con un precipitado visible, y la trombina recombinante permaneció incolora y transparente.

Ejemplo 4

Se reconstituyó un vial (5.000 UI) cada uno de rhTrombina DP, formulación piloto de trombina humana recombinante (Ejemplo 1, formulación T), y trombina bovina (THROMBIN-JMI) con 5,0 ml de solución salina bacteriostática USP. Las concentraciones de sacarosa en las soluciones reconstituidas fueron del 0 % en la trombina bovina, del 0,17 % en la trombina piloto, y del 1,0 % en la rhTrombina DP. Ambas soluciones de rhTrombina fueron transparentes, mientras que la solución de trombina bovina apareció turbia.

Ejemplo 5

Se reconstituyeron viales de rhTrombina DP (5.000 UI) con 5 ml de inyección de solución salina bacteriostática, USP (n = 3). Las muestras reconstituidas se almacenaron invertidas a 2-8 °C durante 1, 2, 4, 6, 9, y 13 semanas, y a 25 °C durante 8, 24, y 48 horas. Después del almacenamiento, las muestras se analizaron para el aspecto, contenido (por RP-HPLC), pureza (RP-HPLC), potencia (actividad de coagulación), e impurezas de alto peso molecular (HMW del inglés high molecular weight) (SE-HPLC). Como se muestra en la Tabla 5, no se observaron inestabilidades remarcables para los periodos de tiempo y condiciones que se evaluaron.

Tabla 5

25 °C (n=3)					
Momento puntual	Contenido (mg/ml)	Pureza (%)	HMW (%)	Actividad de coagulación (UI/ml)	Actividad específica (UI/mg)
Inicial	0,34	91,3	< 0,2	1254	3724
8 h	0,33	91,7	< 0,2	1261	3784
24 h	0,33	92,1	< 0,2	1245	3735
48 h	0,33	92,5	< 0,2	1226	3679
2-8 °C (n=3)					
Momento puntual	Contenido (mg/ml)	Pureza (%)	HMW (%)	Actividad de coagulación (UI/ml)	Actividad específica (UI/mg)
1 semana	0,33	91,9	< 0,2	1170	3582
2 semanas	0,32	91,8	< 0,2	1164	3601
4 semanas	0,33	91,7	< 0,2	1182	3546
6 semanas	0,33	92,2	< 0,2	1243	3766
9 semanas	0,33	92,1	< 0,2	1136	3479
13 semanas	0,32	91,9	< 0,2	1102	3443

Ejemplo 6

Se reconstituyeron viales de rhTrombina DP y formulación piloto (5.000 UI cada una) con 1,6 ml de solución salina bacteriostática. La concentración de sacarosa fue del 3,0 % en la solución de rhTrombina DP y del 0,5 % en la solución piloto de trombina. No se observó precipitación justo después de la reconstitución o después de 24 ó 48 horas a 25 °C.

Ejemplo 7

Se reconstituyeron tres viales de trombina humana recombinante DP (5.000 IV) cada uno con 5 ml de solución salina bacteriostática. No se observó precipitación después de 13 semanas de almacenamiento a 2 - 8 °C.

Ejemplo 8

Se reconstituyó trombina humana recombinante DP con alcohol bencílico al 0,9 % o 2,0 % en solución salina normal. Las muestras se almacenaron a 25 °C. No se observó precipitación en las muestras del 0,9 % inmediatamente después de la reconstitución o después de 48 horas. Las muestras que contenían alcohol bencílico al 2,0 % no mostraron precipitación inmediatamente después de la reconstitución, pero mostraron precipitación a las 24 horas.

Ejemplo 9

Se reconstituyó trombina bovina con solución salina bacteriostática que contenía sacarosa al 1 %. Las muestras se almacenaron a 25 °C. No se observó precipitación inmediatamente después de la reconstitución o después de 24 ó 48 horas.

Ejemplo 10

Se añadieron individualmente los siguientes conservantes a muestras de trombina humana recombinante DP, reconstituidas con solución salina normal: fenol (1 %, p/v), m-cresol (0,2 %, v/v), metilparabeno (0,5 %, p/v), propilparabeno (1 %, p/v), o clorobutanol (0,5 %, p/v). Las muestras se almacenaron a 25 °C. Se observó precipitación en las muestras de fenol y m-cresol después de 24 horas. Las muestras que contenían clorobutanol al 0,5 % permanecieron transparentes a las 24 y 48 horas. El metilparabeno y propilparabeno no eran solubles en solución salina a las concentraciones ensayadas.

A partir de lo anterior, se apreciará que, aunque se han descrito realizaciones específicas de la invención en este documento por motivos de ilustración, pueden hacerse diversas modificaciones sin desviarse del espíritu y alcance de la invención. Por consiguiente, la invención no está limitada excepto por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una composición farmacéutica que comprende:
trombina;
una cantidad bacteriostáticamente eficaz de un conservante seleccionado entre el grupo compuesto por alcohol bencílico y clorobutanol; y
del 0,10 % al 5,0 % (p/v) de sacarosa en solución acuosa.
- 2.- La composición de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente uno o más de un tampón, una sal, un poliol, un tensioactivo, un aminoácido o un carbohidrato adicional.
- 3.- La composición de la reivindicación 1 en la que el conservante es alcohol bencílico y en la que preferiblemente el alcohol bencílico está presente a una concentración del 0,8 % - 1,5 % (v/v).
- 4.- La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:
un tampón farmacéuticamente aceptable, en la que el
conservante se selecciona entre el grupo compuesto por alcohol bencílico a una concentración del 0,8 % al 1,5 % (v/v) o clorobutanol a una concentración del 0,4 % al 0,6 % (p/v) y la solución acuosa está a pH 5,7 - 7,4.
- 5.- La composición de la reivindicación 4 en la que
(1) el conservante es alcohol bencílico, y en la que preferiblemente la concentración de alcohol bencílico es del 0,8 % al 1,0 % (v/v);
(2) la concentración de sacarosa es del 0,5 % al 3,0 % (p/v), preferiblemente de aproximadamente el 1 % (p/v);
(3) el tampón se selecciona de entre el grupo compuesto por los tampones histidina, citrato, fosfato, Tris, succinato y acetato; y/o
(4) el diluyente comprende cloruro sódico.
- 6.- La composición de la reivindicación 1 o reivindicación 4, que comprende adicionalmente manitol, en la que preferiblemente el manitol y la sacarosa están presentes en una proporción de manitol:sacarosa mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1 (p/p).
- 7.- La composición de la reivindicación 1 o reivindicación 4, en la que la trombina es trombina humana, trombina humana recombinante o trombina bovina.
- 8.- La composición de la reivindicación 4, en la que la trombina está presente a una concentración de 0,1 mg/ml a 5,0 mg/ml o una concentración de 0,3 mg/ml a 3,0 mg/ml.
- 9.- La composición de acuerdo con la reivindicación 1 que consta esencialmente de:
0,03 mg/ml a 1,6 mg/ml de trombina;
del 0,17 % al 1,3 % (p/v) de sacarosa;
del 1,1 % al 1,6 % (p/v) de manitol;
del 0,8 % al 2,0 % (p/v) de NaCl;
CaCl₂ 0-1,6 mM, del 0,001 % al 0,32 % (p/v) de un tensioactivo o polietilenglicol de alto peso molecular; un tampón farmacéuticamente aceptable; y
una cantidad bacteriostáticamente eficaz de un conservante seleccionado de entre el grupo compuesto por alcohol bencílico y clorobutanol, en 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 proporción de manitol:sacarosa es mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1 (p/p).
- 10.- La composición de la reivindicación 9 en la que:
(1) la proporción de manitol a sacarosa es 1,33:1 (p/p);
(2) la proporción molar de sacarosa:trombina es de al menos 700:1;
(3) la proporción molar de sacarosa:trombina es de al menos 2000:1; y/o

(4) el conservante es alcohol bencílico a una concentración del 0,8 % al 1,5 % (v/v).

11.- Un procedimiento para preparar una solución estabilizada de trombina que comprende:

proporcionar una composición liofilizada que comprende trombina y una cantidad de sacarosa suficiente para estabilizar la proteína en presencia de una cantidad bacteriostáticamente eficaz de un conservante seleccionado de entre el grupo compuesto por alcohol bencílico y clorobutanol;

proporcionar un diluyente que comprende una cantidad bacteriostáticamente eficaz de alcohol bencílico o clorobutanol en agua; y

combinar la composición liofilizada y el diluyente para formar una solución, en donde la concentración de sacarosa en la solución es del 0,10 % al 5,0 % (p/v), en el que preferiblemente la composición liofilizada comprende adicionalmente un tampón, una sal o un poliol.

12.- Un procedimiento para preparar una solución estabilizada de trombina que comprende:

proporcionar una composición liofilizada que comprende trombina y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable; y

reconstituir la composición liofilizada en un diluyente para proporcionar una solución de trombina farmacéuticamente aceptable, en donde el diluyente se selecciona para proporcionar en la solución una concentración de alcohol bencílico del 0,8 % al 1,5 % (v/v) y una concentración de sacarosa del 0,10 % al 5 % (p/v).

13.- El procedimiento de la reivindicación 12 en el que la solución comprende adicionalmente manitol y en el que preferiblemente el manitol y la sacarosa están presentes en la solución en una proporción de manitol:sacarosa mayor de 1:1 pero no mayor de 2,5:1 (p/p).

14.- Un kit que comprende:

un diluyente farmacéuticamente aceptable que comprende una cantidad bacteriostáticamente eficaz de alcohol bencílico o clorobutanol en agua en un primer recipiente sellado; y

una composición liofilizada que comprende trombina y una cantidad de sacarosa en un segundo recipiente sellado, en donde la cantidad de sacarosa se selecciona para proporcionar una concentración de sacarosa del 0,10 % al 5,0 % (p/v) tras la reconstitución de la composición liofilizada con el diluyente.

15.- El kit de la reivindicación 14 en el que:

(1) el diluyente comprende adicionalmente NaCl y es preferiblemente solución salina bacteriostática;

(2) el kit comprende adicionalmente un medio para transferir el diluyente desde el primer recipiente sellado hasta el segundo recipiente sellado;

(3) el kit comprende adicionalmente una hoja de instrucciones;

(4) el kit comprende adicionalmente un dispositivo aplicador en el que preferiblemente el dispositivo aplicador es una jeringa o un pulverizador; y/o

(5) el primer y el segundo recipientes sellados están envasados en un tercer recipiente.

16.- Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en el tratamiento de un trastorno hemostático.