

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 499 090**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 38/36 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 38/57 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2000 E 02015881 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 1275397**

54 Título: **Medicamento para aplicación local**

30 Prioridad:

19.05.1999 AT 89599

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

26.09.2014

73 Titular/es:

**BIO & BIO LICENSING SA (100.0%)
2 bis, rue Astrid
1143 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es:

EIBL, JOHANN, DR.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 499 090 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

Medicamento para aplicación local

- El cierre de heridas y la hemostasia relacionada con el mismo se realizan fisiológicamente mediante la coagulación de la sangre derramada en el lecho de la herida, con lo que se efectúa el cierre de pequeños vasos sanguíneos y capilares. La curación de herida incipiente posterior se realiza con la ayuda de la matriz extracelular (MEC) provisional formada por la sangre coagulada (Clark, R.A.F. *et al.*, 1982, J. Invest. Dermatol. 70: 264-269; Clark, R.A.F.(ed.), 1996, "The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair", Plenum Press, Nueva York). Esta matriz está compuesta, aparte de células sanguíneas, esencialmente por fibrina como sustancia estructural que sirve como reservorio para una serie de proteínas plasmáticas que son importantes para la curación de heridas incipientes, como fibronectina (Moseson, M.W. y Umfleet, R., 1970, J. Biol. Chem. 245: 5726-5736; Clark, R.A.F. *et al.*, 1982, J. Invest. Dermatol. 70: 264-269), vitronectina (Preissner, K.T. y Jenne, D., 1991, Thromb. Haemost. 66: 189-194), plasminógeno (Castellino, F.J. *et al.*, 1983, Ann. NY Acad. Sci. 408: 595-601), activador de plasminógeno (Thorsen, S. *et al.*, 1972, Thromb. Pathol. Haemost. 28: 65-74), inhibidor de activador de plasminógeno (Wagner, O.F. *et al.*, 1989, Blood 70: 1645-1653) e inhibidor de plasmina $\alpha 2$ (Sakata, Y. y Aoki, N., 1980, J. Clin. Invest. 65: 290-297).
- La cantidad de activador de plasminógeno, inhibidor de activador de plasminógeno e inhibidor de plasmina $\alpha 2$ y la relación entre ellos ejercen un control importante sobre el posterior proceso de degradación de la fibrina. En esta estructura de fibrina, están contenidas sin embargo también otras sustancias como, por ejemplo, trombina, TGF- β y PDGF, que son necesarias para la migración de células y la remodelación múltiple (reconstrucción) de la MEC provisional hasta la MEC definitiva con las correspondientes poblaciones celulares.
- En primer lugar, migran en grandes cantidades granulocitos a la zona de la herida y al cierre de la herida. Liberan distintas sustancias importantes para el proceso de curación de la herida incipiente, particularmente colagenasas y elastasas, y destruyen los microorganismos extracelulares e intracelulares que acceden a la zona de la herida y pueden multiplicarse allí. Mientras la migración de granulocitos llega a su fin, aparecen en la zona de la herida cada vez más monocitos, incluyendo macrófagos. El tercer día, llega el brote de fibroblastos en la zona de la herida, que acceden hasta la superficie del cierre de la herida mediante las hebras de fibronectina. Después del crecimiento de los capilares sanguíneos, se llega a una serie de transformaciones celulares y procesos de remodelación que conducen en la mayoría de casos de nuevo a la integridad total del tejido dañado (Clark, R.A.F.(ed.), 1996, "The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair", Plenum Press, Nueva York).
- Los primeros ensayos, que datan ya de hace 80 a 90 años, de cierre de heridas con la ayuda de plasma sanguíneo no alcanzaron ningún éxito debido a la viscosidad relativamente baja en comparación con la sangre, de la baja adherencia al lecho de la herida y debido a la alta fragilidad del coágulo de plasma coagulado formado en todo caso por plasma.
- El uso de soluciones de fibrinógeno enriquecidas en lugar de plasma para la hemostasia y para el cierre de heridas en principio no tuvo igualmente éxito, pero finalmente pudo conseguirse un éxito importante mediante la elevación de la concentración de fibrinógeno de dichas soluciones que contienen fibrinógeno a más de 10 veces el nivel de fibrinógeno en plasma (Löblich, 1975, comunicación no publicada).
- En la transformación de fibrinógeno en fibrina, existe la posibilidad de que se desprenda el cierre de herida de fibrina hemostático eficaz después de varias horas por enzimas del lecho de la herida y se llegue así a una hemorragia secundaria. El desprendimiento del cierre de herida de fibrina del lecho de la herida es el proceso esencialmente más frecuente, y por tanto más peligroso, en la fibrinólisis de todo el cierre de la herida de fibrina.
- Ya en las primeras aplicaciones exitosas de soluciones de fibrinógeno de alta concentración (Matras, H. *et al.*, 1972, Wr. Med. Wschr. 122: 517-523), la transformación de fibrinógeno en fibrina mediante trombina en la zona de la herida ha mostrado que pueden evitarse la retirada del cierre de herida de fibrina y las hemorragias secundarias que ocurren así la mayoría de veces mediante inhibidores de la fibrinólisis. De los inhibidores de bajo peso molecular experimentados, han podido encontrarse como eficaces el ácido ϵ -aminocaprónico y derivados, sin embargo estos presentaban la desventaja de difundirse rápidamente desde la fibrina coagulada y desde la zona de la herida y por tanto perder su eficacia local.
- La adición de inhibidores de alto peso molecular como, por ejemplo, aprotinina (Trasylo) ha podido llevarse a cabo exitosamente llegando a solo una lenta difusión del inhibidor a partir de la zona la herida, sin embargo con la desventaja de que se trata en este sentido de un inhibidor de proteasa bovino, y por tanto xenogénico, que puede causar alergias y anafilaxis potenciales. Últimamente, se han puesto objeciones contra el uso de materiales animales para aplicación parenteral a personas debido a la potencial capacidad de transmisión de zoonosis.
- En el documento WO-A-99/11301, se hace la propuesta de usar inhibidores de elastasa u otros inhibidores eficaces contra proteasas leucocíticas en lugar de aprotinina. Esta propuesta ocasiona sin embargo, al entender del inventor de la presente invención, distintas desventajas. Ciertamente, estos inhibidores son eficaces directa o indirectamente mediante la inhibición de enzimas que pueden activar el sistema fibrinolítico, pero pueden alterar la iniciación de la

curación de heridas por migración de los granulocitos a la zona de la herida por una fuerte inhibición de las proteasas liberadas por granulocitos, como colagenasas y elastasas.

5 Otra dificultad en la preparación de medicamentos farmacéuticos que contienen fibrinógeno y trombina que pueden contener un inhibidor de proteasa alogénico y un zimógeno de transglutaminasa está dada por la inactivación vírica necesaria desde hace largo tiempo de dichos preparados. Con la inactivación vírica, se pierde la mayoría de veces una gran parte de la actividad del inhibidor de proteasa o zimógeno de transglutaminasa contenido en el preparado, de modo que los preparados obtenidos después de la práctica de la inactivación vírica a menudo presentan ya solo una baja actividad del inhibidor de proteasa o zimógeno de transglutaminasa. Por ello, puede llegarse a una inhibición insuficiente de las enzimas fibrinolíticas presentes en el lecho de la herida y como consecuencia a la liberación del cierre de herida de fibrina del lecho de la herida.

10 Las soluciones concentradas de fibrinógeno presentan una serie de desventajas. Son de baja estabilidad al almacenamiento, deben congelarse o liofilizarse para almacenamiento y no siempre pueden volverse satisfactoriamente utilizables o reconstituirse mediante descongelación o redisolución. Además, la disolución de un liofilizado de fibrinógeno ocupa largo tiempo. Los solubilizantes o fibrinógenos fácilmente solubles son tóxicos celulares la mayoría de veces y por tanto no procedentes para una curación de heridas sin problemas.

La mayor dificultad en el almacenamiento de productos que contienen fibrinógeno es la inestabilidad del fibrinógeno, ya que las trazas de impurezas con factores de coagulación causan una transformación lenta de fibrinógeno en fibrina insoluble, lo que no permite ya entonces la aplicación de dicho preparado farmacéutico.

La presente invención evita esta desventaja.

20 Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una solución que contiene fibrinógeno que es estable a temperatura de frigorífico o temperatura ambiente y que se caracteriza porque la solución de fibrinógeno se prepara a partir de fibrinógeno preparado por ingeniería genética o fibrinógeno producido a partir de plasma mediante fraccionamiento con glicina a temperaturas menores de 0 °C.

25 Las soluciones que contienen fibrinógeno preparadas según la invención son estables y pueden almacenarse en estado líquido con o sin estabilizadores durante dos años a una temperatura de 4-8° C, o congeladas o liofilizadas, sin que precipite a este respecto fibrina insoluble o se formen productos de disociación de fibrinógeno por la generación de plasmina durante el almacenamiento en una medida que perjudique la coagulabilidad. Dichas soluciones no coagulan por adición de tromboplastina y veneno de víbora taipán ni por adición de tromboplastina parcialmente activada. En el almacenamiento en estado congelado, y después del descongelamiento repetido de las soluciones que contienen fibrinógeno preparadas según la invención, no se inducen procesos de coagulación, y las soluciones obtenidas son estables al menos varias horas. Las preparaciones liofilizadas son fácil y completamente reconstituibles con los correspondientes disolventes.

Ejemplos

Ejemplo 1 (invención):

35 Producción de una solución de fibrinógeno estable

Se usan como material de partida 100 l de plasma adecuado para la producción de medicamentos o la fracción I de Cohn producida con la ayuda de una precipitación con etanol en frío por congelación del plasma y cuidadoso descongelamiento del precipitado frío producido.

40 Se mezcla el plasma como tal, la fracción de Cohn I y el precipitado frío después de disolución en aproximadamente 20 l de NaCl al 0,9 % y tampón de citrato de sodio al 0,1 % a pH 7 con glicina sólida con un grado de pureza de preparados farmacéuticos hasta saturación, y se enfría a este respecto a -2 a -3 °C, se almacena al menos durante 10 a como máximo 15 horas a esta temperatura, se separa la glicina no disuelta y se separa el residuo que contiene fibrinógeno-fibronectina mediante centrifugación en una centrifuga en modo rápido.

Los sobrenadantes pueden usarse en procesamientos adicionales para aislar así otras proteínas plasmáticas.

45 Se retira el precipitado gelatinoso del rotor de la centrifuga, se disuelve y se precipita como anteriormente con glicina. Se disuelve el sedimento obtenido después de la centrifugación en citrato al 0,1 % y se repite este proceso de reprecipitación hasta resultar un aPTT de no menos de 200 s de una muestra del sedimento obtenido suspendido en agua destilada con un contenido de fibrinógeno de 0,1-0,2 % a 37 °C con un reactivo de PTT. Igualmente, después de la adición de tromboplastina y veneno de víbora taipán, debe alcanzarse un tiempo de coagulación que se encuentre a no menos de 300 s.

50 El último precipitado rediseñado adecuado para procesamiento adicional se libera mayoritariamente de glicina mediante diafiltración frente a una solución de citrato al 0,1 % y se concentra a este respecto a 2-3 % de contenido de proteína.

El fibrinógeno así producido contiene también cantidades importantes de fibronectina. En caso que se desee, puede separarse la fibronectina mediante precipitación a -2 a -3 °C con glicina al 17 %. A este respecto, precipita prácticamente todo el fibrinógeno y se encuentra en el sobrenadante la fibronectina con cantidades pequeñas de fibrinógeno. Mediante saturación con glicina, pueden precipitarse y producirse conjuntamente ambas proteínas. En cualquier caso, las bajas actividades presentes de activador de plasminógeno o plasmina pueden elevarse de actividad mediante la adición de inhibidores de bajo peso molecular en baja cantidad como ácido ε-aminocaprónico o derivados.

La inactivación vírica del fibrinógeno altamente purificado o del complejo de fibrinógeno-fibronectina puede realizarse mediante mezclado de plasma de la fracción de Cohn I disuelta o del precipitado frío disuelto con detergentes y humectantes o con un procedimiento de impulsos térmicos o luz láser. La solución de fibrinógeno con inactivación vírica puede almacenarse como tal a temperatura de frigorífico de 4 a 8 °C, congelarse o liofilizarse para almacenamiento.

Ejemplo 2 (comparativo):

Preparación de una solución de trombina con potencial generador de trombina.

Se obtuvo esta solución de trombina mediante mezclado de dos soluciones en igual medida que se produjeron a partir de plasma humano adecuado para la preparación de medicamentos para aplicación a seres humanos. Ambas soluciones están exentas de pirógenos, exentas de iones de Ca y son estériles. Una solución contiene trombina exenta de virus a una concentración a seleccionar de 20 a 2.500 unidades/ml, la otra contiene una mezcla de protrombina-factores de coagulación exenta de virus que puede generar al menos 1000 unidades de trombina por ml después de la adición de iones de Ca.

Esta mezcla se mezcla a un centésimo de proporción de volumen con una solución estéril de polietilenglicol al 10 % (pureza farmacéutica) y la mezcla se rellena entonces, según la dosificación deseada, en matraces transparentes o jeringuillas precargadas y se congela, en caso necesario se liofiliza, se cierra, se almacena, se etiqueta y se empaqueta.

Ejemplo 3 (comparativo):

Preparación de medicamentos adecuados para seres humanos para aplicación local de preparados farmacéuticos que contienen fibrina y trombina.

Se usan 800 ml de un preparado de principio activo líquido exento de pirógenos según el ejemplo 1, que se ha producido a partir de plasma humano adecuado para la preparación de medicamentos para seres humanos y que presenta un contenido de fibrinógeno de al menos un 6 %, para la disolución de un preparado farmacéutico producido a partir de plasma humano adecuado para la preparación de medicamentos para seres humanos, que presenta 1.200 unidades de PAI-1 arbitrarias referidas a plasma humano u otra serpina, o mezcla de serpinas, que no presenta efecto inhibitorio de colagenasa o elastasa y contiene un contenido de zimógeno de transglutaminasa equivalente al menos a 4.000 unidades de factor XIII. El preparado contiene además 2 g de CaCl₂.

Este preparado farmacéutico que contiene fibrinógeno se mezcla ahora con el preparado que contiene trombina dado en el ejemplo 2, después de su reconstitución con la correspondiente cantidad de agua para inyecciones, a saber 4 partes de preparado que contiene fibrinógeno con 1 parte del preparado que contiene trombina.

Ejemplo 4 (comparativo):

Preparación de una matriz extracelular alogénica provisional como medicamento

Se vierte una cantidad determinada de mezcla según el ejemplo 3 en un molde esterilizado adecuado y se incuba durante 5 horas en condiciones estériles a entre 35 y 37 °C. La matriz extracelular formada en el molde, estéril, exenta de pirógenos, exenta de virus y alogénica para uso en seres humanos, se empaqueta en cubiertas de polietileno estériles impermeables al vapor, se suelda y se almacena a temperatura de frigorífico de 4-8 °C para autorización después de los correspondientes controles de calidad. Después de etiquetar, empaquetar y autorizar, puede ponerse en circulación el medicamento.

Ejemplo 5 (comparativo):

Preparación de una matriz extracelular alogénica provisional mediante mezclado de tres preparados farmacéuticos que se ofrecen como medicamento combinado.

El medicamento contiene tres preparados farmacéuticos que forman después de mezclar una matriz extracelular alogénica provisional:

- a. una solución de fibrinógeno al 6 % según el ejemplo 3,

b. una mezcla liofilizada de zimógeno de transglutaminasa, serpina o mezcla de serpinas, exenta de efecto inhibidor de colagenasa y elastasa y cloruro de calcio en las cantidades dadas en el ejemplo 3,

c. una solución de trombina liofilizada según el ejemplo 2.

5 En el medicamento, está presente además agua para inyecciones, que se emplea para disolver el preparado farmacéutico que contiene trombina según el ejemplo 2, mientras que el preparado farmacéutico que contiene zimógeno de transglutaminasa y serpina se disuelve en la solución de fibrinógeno al 6 % según el ejemplo 3. Después del mezclado de la solución que contiene fibrinógeno con la que contiene trombina, se incorpora esta a un molde estéril exento de pirógenos deseado antes de la coagulación de esta mezcla, y después de la solidificación se separa del molde y se aplica localmente en el lugar deseado o los lugares deseados, formando solo entonces localmente una matriz extracelular alogénica provisional para seres humanos.

Ejemplo 6 (comparativo):

Matriz extracelular alogénica provisional reforzada biomecánicamente mediante el uso de colágeno alogénico.

15 A la mezcla de los preparados farmacéuticos según el ejemplo 4 y 5, puede incorporarse colágeno humano fibrilar, estéril, exento de pirógenos y exento de virus, a saber 5-100 mg/ml, o aplicarse la mezcla sobre una compresa de colágeno en forma de espuma rápidamente absorbente, ajustándose el contenido de trombina de la mezcla de modo que ocurra la formación de fibrina solo después de acabado el proceso de absorción. Dicha compresa puede usarse inmediatamente después del inicio del proceso de coagulación o después de incubación durante 5 horas a entre 35 y 37 °C empaquetada estéril, para procesamiento adicional del medicamento preparado.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de una solución que contiene fibrinógeno que es almacenable a temperatura de frigorífico o temperatura ambiente, caracterizado por que la solución de fibrinógeno se prepara a partir de fibrinógeno preparado por ingeniería genética o a partir de fibrinógeno producido a partir de plasma mediante fraccionamiento con glicina a temperaturas menores de 0 °C.
- 5