

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 755**

51 Int. Cl.:

B02C 19/06 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2007 PCT/IL2007/001318**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2008 WO08053475**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2007 E 07827292 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2106296**

54 Título: **Procedimiento de micronización**

30 Prioridad:

02.11.2006 US 856042 P

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

15.01.2018

73 Titular/es:

**OMRIX BIOPHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)
WEIZMANN SCIENCE PARK 14B EINSTEIN
STREET
NES-ZIONA 74036, IL**

72 Inventor/es:

**NUR, ISRAEL y
BAR, LILIANA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 649 755 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

Procedimiento de micronización

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la reducción del tamaño de partícula de los polvos de proteína.

Antecedentes de la invención

10 En los últimos años, ha surgido la necesidad de la fabricación de dispersiones farmacéuticas en polvo de tamaño de partícula de micrómetros y submicrómetros que tengan una distribución de tamaño de partícula controlada y estrecha. Las aplicaciones de dichos polvos incluyen, por ejemplo, la entrega de aerosoles farmacéuticos mediante inhaladores de polvo seco, el aumento de biodisponibilidad de fármacos no hidrosolubles y dispositivos hemostáticos compuestos de una matriz de material compuesto biodegradable en la que se impregnan polvos liofilizados de factores de coagulación. El procedimiento de moler un polvo a un tamaño de partícula de micrómetros y submicrómetros se conoce como *micronización*.

15 Entre los procedimientos de micronización conocidos existen procedimientos que implican velocidades de cizalla altas y aportaciones de alta energía, tales como la molienda por chorro o los sistemas de pulverización, la molienda con bolas, la homogeneización a alta presión y la microfluidificación. Dichos procedimientos generalmente son incompatibles con moléculas biológicas que son sensibles a la degradación térmica y/o física. Otros procedimientos conocidos, más suaves, incluyen el secado por pulverización, la recristalización, la extracción de emulsión-disolvente y procedimientos que usan fluidos supercríticos tales como la Expansión Rápida de Soluciones Supercríticas (ERSS).

20 También se conocen cámaras de torbellino o vórtice para la molienda. Por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 4.502.641 desvela una combinación del principio de molienda por chorro con una cámara de vórtice. También se conocen cámaras de vórtice de molienda que realizan una denominada molienda de torbellino por resonancia. El documento WO 94/08719 describe un aparato de molienda de cámara de torbellino equipado con boquillas de inyección de fluido tangenciales que realiza una denominada "molienda de vórtice por resonancia".

30 La Patente de los EE.UU. N.º 5.855.326 de Beliavsky desvela una cámara de molienda de torbellino para la trituración fina de un material sólido en forma de partículas, estando formada la cámara en una carcasa que tiene una forma sustancialmente cilíndrica con dos caras terminales y una pared lateral provista de una o más boquillas tangenciales para la inyección de un fluido de trabajo dentro de la cámara y la creación de un vórtice en la misma, comprendiendo dicha cámara medios para la introducción en la misma de un material sólido en forma de partículas que se ha de triturar, un paso de descarga dispuesto axialmente provisto en una o ambas dichas caras terminales y medios de control en forma de uno o más elementos mecánicos adaptados para interactuar, cuando se crea el vórtice, con sus capas en movimiento cerca de las paredes interiores de la cámara, permitiendo de este modo el control de la trituración. La operación de la cámara de torbellino se ejemplifica en la patente usando arena.

35 La Patente de los EE.UU. N.º 6.789.756 de Beliavsky desvela un molino de vórtice mejorado para la molienda de un material sólido sustancialmente en forma de partículas, que incluye una o más cámaras de trabajo. El molino también incluye una o más entradas de fluido de trabajo y uno o más orificios de descarga. Una o más entradas de fluido de trabajo junto con uno o más orificios de descarga facilitan el flujo de vórtice dentro de la una o más cámaras de trabajo. También hay una o más entradas de alimentación para proporcionar la molienda del material sólido, que se descarga desde uno o más orificios de descarga. Además, hay un aparato para inducir perturbaciones controladas en el flujo del fluido de trabajo en la una o más cámaras de trabajo, permitiendo de este modo mejorar la molienda del material sólido en el flujo de vórtice.

45 El vellón de fibrina Hércules es un dispositivo hemostático compuesto de una matriz de material compuesto biodegradable de Vicryl™ no tejido, tejido en Celulosa Regenerada Oxidada tejida (CRO, Interceed™), en la que se impregnan polvos liofilizados de fibrinógeno y trombina a través de una suspensión en un disolvente volátil.

El documento EP 0384752 A desvela la reducción del tamaño de partícula de material proteínico amorfo a partículas uniformes sin descomposición de proteínas o pérdida de actividad haciendo pasar el material a través de un molino de energía fluida (también denominado molino de chorro).

50 El documento US 5 354 562 A desvela el uso de molinos de energía fluida que se han equipado con materiales resistentes a la abrasión; la adición de estabilizadores de molienda durante la molienda y el uso de nitrógeno filtrado en la molienda para reducir los contaminantes insolubles y fracciones inactivas en el producto molido.

El documento US 2004/0121003 desvela el uso de molienda de chorro para un procedimiento de desaglomeración de micropartículas que se han aglomerado cuando se mezclaron con un excipiente. El procedimiento mantiene sustancialmente el tamaño y la morfología de las micropartículas individuales.

Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento mecanizado para la micronización de una dispersión de partículas de proteína a una distribución de tamaño de partícula definida conservando sustancialmente la actividad de la proteína al mismo tiempo.

5 La presente invención proporciona las siguientes realizaciones definidas en los puntos 1-14 a continuación:

1. Un procedimiento de micronización de una dispersión de partículas de proteína o de una dispersión de partículas que comprenden una proteína, teniendo la proteína un nivel predeterminado de actividad biológica, caracterizado porque el procedimiento comprende:

10 la introducción de la dispersión en un aparato de molienda de cámara de vórtice que comprende boquillas de inyección de fluido tangenciales, que realiza la molienda de torbellino por resonancia usando gradientes de presión; y la molienda de la dispersión en condiciones de molienda que comprenden una presión de entrada en el intervalo de 1 a 7 bares, una velocidad de carga en el intervalo de 0,1 a 5 kg/hora y un flujo de gas en el intervalo de 30 a 100 m³/hora y, opcionalmente, una presión del inyector en el intervalo de 0,2 a 5 bares, obteniéndose de este modo un polvo de proteína que conserva al menos el 80 % del nivel predeterminado de actividad biológica y tiene una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 5 a 100 μm o que presenta una reducción de 30 a 400 veces del tamaño original de las partículas en la dispersión.

2. El procedimiento de acuerdo con el punto 1 en el que las partículas en la dispersión tienen grietas o cavidades.

20 **3.** El procedimiento de acuerdo con el punto 1 o 2 en el que la dispersión se prepara mediante un procedimiento de secado por congelación.

4. El procedimiento de acuerdo con uno de los puntos 1 a 3, que comprende adicionalmente la trituración mecánica de la dispersión antes de la molienda.

5. El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 4 en el que la proteína es una enzima y la actividad biológica es su actividad enzimática.

25 **6.** El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 4 en el que la proteína es un factor de coagulación y la actividad biológica es su actividad de coagulación.

7. El procedimiento de acuerdo con el punto 1 en el que la cámara de vórtice de molienda está contenida dentro de un Super Fine Vortex Mill™ (SFVM).

30 **8.** El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 7 en el que la distribución del tamaño de partícula es de 10 a 100 μm.

9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 8 en el que al menos el 90 % de las partículas después de la molienda están dentro de la distribución del tamaño de partícula.

10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 9 en el que el polvo de proteína conserva al menos el 90 % de la actividad biológica predeterminada.

35 **11.** Un procedimiento de micronización de una dispersión de partículas de proteína de acuerdo con el punto 1, en el que las condiciones de molienda comprenden una presión de entrada de 2 bares, una presión del inyector de 2 bares, una velocidad de carga en el intervalo de 2 a 5 kg/hora, aproximadamente 1,6, 2, 2,7, 3 o 4,2 kg/hora y un flujo de gas en el intervalo de 30 a 100 m³/hora, obteniéndose de este modo un polvo de proteína que tiene una distribución de tamaño de partícula de 10 a 60 μm y que conserva al menos el 90 % del nivel predeterminado de actividad biológica.

40 **12.** Un procedimiento de micronización de una dispersión de partículas de proteína de acuerdo con el punto 1 en el que las condiciones de molienda comprenden una presión de entrada de 2 bares, una presión del inyector de 2 bares, una velocidad de carga en el intervalo de 2 a 5 kg/hora, aproximadamente 1,6, 2, 2,7, 3 o 4,2 kg/hora y un flujo de gas en el intervalo de 30 a 100 m³/hora, obteniéndose de este modo un polvo de proteína que presenta una reducción de 30 a 400 veces del tamaño original de la dispersión de partículas de proteína y que conserva al menos el 90 % del nivel predeterminado de actividad biológica.

45 **13.** Un procedimiento de micronización de una dispersión de partículas de acuerdo con el punto 1 en el que las condiciones de molienda comprenden una presión de entrada en el intervalo de 1 a 4 bares, una velocidad de carga en el intervalo de 1 a 5 kg/hora, un flujo de gas en el intervalo de 30 a 100 m³/hora, y, opcionalmente, una presión del inyector de 2 bares.

50 **14.** El procedimiento de acuerdo con el punto 13, en el que las condiciones de molienda comprenden una presión del inyector de 2 bares.

55 La presente divulgación proporciona un procedimiento de micronización de una dispersión de partículas que comprende una proteína que tiene un nivel predeterminado de actividad biológica, comprendiendo el procedimiento la introducción de la dispersión en un aparato de molienda de cámara de vórtice en condiciones de molienda que dan como resultado un polvo de proteína que tiene una distribución de tamaño de partícula de 5 a 100 μm y que conserva al menos el 80 % del nivel predeterminado de actividad biológica de la proteína, en el que las condiciones de molienda incluyen uno o más parámetros seleccionados entre: presión de entrada de entre 1 y 7 bares; presión del inyector de entre 0,2 y 5 bares; velocidad de carga de entre 0,1 y 5 kg/hora; y flujo de gas de entre 30 y 60 100 m³/hora.

El procedimiento de la invención permite ventajosamente la obtención de polvo de proteína que tiene una distribución de tamaño de partícula uniforme y controlada.

En una realización de la presente invención, las partículas de la dispersión inicial de partículas de proteína se producen *a priori* para que tengan grietas o cavidades u otras imperfecciones estructurales que constituyan puntos débiles que pueden ayudar en desintegración de la partícula en el procedimiento de molienda. En una realización, la dispersión de partículas de proteína se prepara mediante un procedimiento de secado por congelación, tal como la liofilización. La liofilización se realiza normalmente mediante secado por congelación e implica la retirada del agua de una suspensión celular congelada mediante sublimación a presión reducida. También se conocen bien en la técnica de la producción de polvo de proteína y pueden usarse procedimientos de deshidratación alternativos que extraen agua del material de proteína. En una realización adicional, la dispersión secada por congelación se tritura mecánicamente antes de la molienda. En una realización adicional más de la invención, la dispersión se tritura mecánicamente en partículas que se pasaron por un tamiz SS de 2 mm.

La proteína tratada en el procedimiento de la invención tiene una actividad biológica, es decir, una actividad que tiene un efecto sobre uno o más procesos fisiológicos en el cuerpo humano. Por ejemplo, la proteína puede ser una enzima y la actividad biológica correspondiente sería la actividad enzimática-catalítica de la enzima. Los ejemplos no limitantes de proteínas que pueden usarse en la invención incluyen cualquier proteasa de la cascada de la coagulación y su sustrato de proteasa; proteínas de la cascada del complemento y su contraparte; factores de crecimiento y sus receptores; hormonas y sus receptores; inmunoglobulinas; enzimas anabólicas y catabólicas; enzimas que catalizan las siguientes reacciones bioquímicas: fosforilación, desfosforilación, carboxilación, hibridación, proteólisis, trans-aminación, desaminación, oxidación, hidrogenación, hibridación, hidrólisis, isomerización, inversión, glucólisis, polimerización de ADN y ARN, esterificación, etc. En una realización, la proteína es un factor de coagulación y la actividad biológica es la actividad de coagulación. La proteína puede ser trombina o fibrinógeno. La proteína puede ser una mezcla de una o más de dichas proteínas. La proteína puede ser Bac2. La proteína también puede ser trombina.

La proteína puede ser sintética, de origen natural, preparada por procedimientos transgénicos o recombinantes, incluyendo proteínas procesadas, desnaturalizadas o modificadas de otro modo.

El nivel de actividad biológica puede predeterminarse mediante ensayos biológicos convencionales que son bien conocidos para el experto en la materia. Por ejemplo, si la proteína es una enzima, su actividad biológica puede determinarse mediante la realización de uno o más ensayos que miden la actividad. En un ejemplo específico, para determinar la actividad de coagulación del fibrinógeno, puede usarse el *ensayo de Clauss* (a un volumen y dilución adecuados de la muestra de fibrinógeno mantenida a 37 °C, se añade una solución de trombina humana [aprox. 20 UI/ml y que contiene al menos 1 mmol/litro de calcio]; se determina el tiempo de coagulación y se calcula la actividad frente a una curva de calibración preparada usando un patrón de fibrinógeno apropiado) o puede determinarse el fibrinógeno coagulable midiendo la absorbancia a 280 nm. En otro ejemplo específico, la actividad de coagulación de la trombina puede determinarse mediante el *procedimiento de coagulación* (a un volumen y dilución adecuados, se añade una solución de fibrinógeno [1 g/l de proteína coagulable] calentada a 30 °C y el tiempo de coagulación se mide inmediatamente. La actividad de la preparación del ensayo se calcula frente a una curva de calibración preparada con una preparación de referencia de trombina).

El aparato de molienda de cámara de vórtice utilizado en la invención comprende boquillas de inyección de fluido tangenciales y la molienda de torbellino por resonancia se realiza usando gradientes de presión. Se cree que los cambios de presión de gas rápidos en la cámara de vórtice provocan la desintegración de las partículas a lo largo de sus planos de debilidad. En una realización, el aparato de molino es como se desvela en la Patente de los EE.UU. N.º 5.855.326. En otra realización, el aparato de molino es como se desvela en la Patente de los EE.UU. N.º 6.789.756. Un ejemplo de un aparato de molienda de este tipo es el Super Fine Vortex Mill™ (SFVM) fabricado por Super Fine Ltd. de Yokneam, Israel (mostrado esquemáticamente en la Figura 6).

Las condiciones de molienda pueden incluir uno o más de los siguientes parámetros:

(a) Presión del flujo entrante de la dispersión dentro del molino (= presión de entrada) - será generalmente de entre 1 y 7 bares, estando el límite inferior dentro del intervalo de 1-3 bares (por ejemplo, 1, 2 o 3 y estando el límite superior dentro del intervalo de 4-7 bares (por ejemplo, 5, 6 o 6,3 bares;

(b) Presión en el inyector de alimentación (= presión del inyector - en los casos en los que se usa un inyector para la alimentación *) - será generalmente de entre 0,2 y 5 bares. En una realización de la invención, la presión del inyector es de 2 bares;

(c) Velocidad de carga - será generalmente de entre 0,1 y 5 kg/hora, estando el límite inferior dentro del intervalo de 0,1-2 kg/hora (por ejemplo, 0,2, 0,4, 0,6 o 1,6 kg/hora) y estando el límite superior dentro del intervalo de 3-5 kg/hora (por ejemplo, 2,4, 2,8, 3,0, 3,7 o 4,2 kg/hora); y

(d) Flujo de gas desde el conducto de inyección de fluido hasta el conducto de descarga (= flujo de gas**) - será generalmente de entre 30 y 100 m³/hora (por ejemplo, 35, 40, 50, 58, 60, 69, 70, 80 o 90 m³/hora).

* El flujo entrante de la dispersión por lo general es alto y el vacío formado en el molino aspira el polvo dentro la cámara. Debido a que el flujo entrante en el procedimiento de la invención es relativamente bajo, no hay suficiente succión del polvo dentro de la cámara y, por tanto, con frecuencia se necesita un inyector de

alimentación.

** Puede usarse cualquier gas inerte en el flujo de gas desde el conducto de inyección de fluido hasta el conducto de descarga (aire seco, argón, nitrógeno, etc.). En los ejemplos a continuación, se usa aire.

5 En otra realización de la invención, el polvo de proteína resultante tiene una distribución de tamaño de partícula de 5 a 100 μm , siendo el límite inferior de 5, 10, 15 o 20 μm y siendo el límite superior de 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 μm . En una realización adicional, el tamaño de al menos el 90 % de las partículas, más preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 97 %, está dentro de la distribución del tamaño de partícula. En una realización adicional de la invención, el polvo de proteína conserva al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, de la actividad biológica predeterminada.

10 En una realización adicional más, la micronización da como resultado una reducción del tamaño de 30 a 400 veces del polvo de proteína a partir de su tamaño original.

15 La divulgación de intervalos se entiende fácilmente por el experto. Esto significa la divulgación de cifras y valores continuos entre los límites de los intervalos, incluyendo las cifras y valores límite. Por ejemplo, si se proporciona un intervalo de 1 a 7, se entiende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 con todas las combinaciones de subintervalos intermedios tales como 1 y 2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6 o 1-7 y 2 y 3, 2-4, 2-5, 2-6 o 2-7 y así sucesivamente.

Breve descripción de los dibujos

Con el fin de entender la invención y de ver cómo puede realizarse en la práctica, se describirá ahora una realización preferida, a modo de ejemplo no limitante, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

20 La **Figura 1** muestra una comparación del perfil de distribución de tamaño de polvo de fibrinógeno2 humano, molido a mano frente a SFVM;
 La **Figura 2** muestra el perfil de distribución de tamaño de fibrinógeno2 humano molido a diversas presiones de molienda;
 La **Figura 3** muestra el perfil de distribución de tamaño de trombina molida a diversas presiones de molienda;
 25 La **Figura 4** muestra el perfil de distribución de partículas de dos lotes de fibrinógeno2 humano (n.º 4 y n.º 5) molidos en el mismo día usando los mismos parámetros de operación convencionales;
 La **Figura 5** muestra la distribución de partículas de dos lotes fibrinógeno2 humano (n.º 6 y n.º 7) molidos en serie en el mismo día usando los mismos parámetros de operación convencionales; y
 La **Figura 6** muestra una vista con un corte transversal esquemática del SFVM.

Descripción detallada de realizaciones de ejemplo

30 Una realización de ejemplo de la invención se describirá con respecto al SFVM, producido por Super Fine Ltd. Yokneam, Israel. Se ha de entender, sin embargo, que la invención puede ponerse en práctica con otros tipos de máquinas de molienda de acuerdo con la invención.

I. MATERIALES

35 Producto biológico

Todos los lotes de productos biológicos -fibrinógeno2 humano y trombina- se liofilizaron en PF1, Tel Hashomer, Israel. El fibrinógeno2 humano (también denominado a veces BAC2) es un crioprecipitado inactivado por virus concentrado de plasma humano (el crioprecipitado normalmente se prepara como se describe en el documento EP 534.178), que consiste principalmente en fibrinógeno (aprox. el 85 %) y está empobrecido en plasminógeno (la retirada del plasminógeno se realiza normalmente como se describe en el documento EP 1.390.485) y sin agentes antifibrinolíticos añadidos. El producto biológico llegó en forma de una torta liofilizada en una bandeja de plástico LyoGuard® envuelta dos veces con una bolsa de papel de aluminio y una bolsa de polietileno gruesa. Las bandejas envueltas dos veces se mantuvieron a 2-8 °C hasta que se molieron.

Vehículo

45 Se usó hidrofluorocarbono (HFE)-7000 como vehículo del producto biológico. Sin embargo, el material biológico puede suspenderse en cualquier disolvente adecuado y el HFE es solamente un ejemplo no limitante.

II. MÉTODOS

50 Los productos biológicos se liofilizaron en LyoGuard®. Todos LyoGuards se llenaron con 1,5 litros de ya sea fibrinógeno2 o trombina humanos. Los productos liofilizados y secos se transfirieron a la instalación de ensayo envueltos en papel de aluminio. En el lugar del ensayo, las envolturas de papel de aluminio se abrieron y la torta se trituró primero mecánicamente mediante espátula contra un tamiz SS de 2 mm y después el polvo grueso se alimentó al SFVM a través de una cinta transportadora. La presión del inyector y el molino se prefijó antes de cargar el producto y se afinó a la presión deseada durante la operación. La velocidad de carga se mantuvo pesando previamente el producto en alícuotas; la carga de cada alícuota se programó con cuidado. Los polvos se recogieron

en frascos de vidrio unidos al extremo del embudo SS de ciclón.

Se realizaron los siguientes ensayos para determinar la actividad biológica y los parámetros físicos:

1. Contenido de agua - Karl Fisher
2. Distribución del tamaño de partícula – La distribución del tamaño de partícula puede medirse con un Beckman Coulter LS 13 320, que permite la determinación de la distribución del tamaño de partícula de un polvo ya sea en un líquido o en forma de polvo seco mediante el uso de los principios de dispersión de la luz. El Coulter permite la medición de tamaños de partícula en el intervalo de 0,375 µm-2,000 µm, realizada en polvo dispensado en HFE7000.
3. Actividad de coagulación del fibrinógeno - ensayo de Clauss [descrito anteriormente].
4. Fibrinógeno coagulable por absorbancia a 280 nm - Para determinar cuantitativamente el fibrinógeno coagulable, la muestra ensayada se mezcló con trombina y se formó un coágulo. Se usó sodio-EDTA como quelante del cofactor de reacción (Ca⁺⁺) y se inhibió la activación de FXIII a FXIIIa (plasma-transglutaminasa) mediante trombina, evitando de este modo la formación del puente gamma-glutamyl-épsilon-lisina de proteína no coagulable a la fibrina. Estas proteínas no coagulables que no estaban reticuladas con la red de fibrina se retiraron secando primero el coágulo sobre un papel de filtro, seguido de lavados sucesivos con solución salina. Posteriormente, el coágulo se solubilizó en una solución de urea/NaOH y la cuantificación de fibrinógeno coagulable se realizó mediante la medición a 280 nm (después de la reducción de la dispersión de luz a 320 nm) frente a un patrón interno conocido.
5. Para la determinación de la proteína total, el fibrinógeno coagulable, la determinación de fibrinógeno por Clauss y para la determinación de la potencia de la trombina mediante el tiempo de coagulación en muestras liofilizadas y/o molidas de fibrinógeno y trombina, respectivamente, los polvos deben volver a suspenderse en una solución de tampón adecuada.
6. Actividad de la trombina mediante el procedimiento de coagulación [descrito anteriormente].

III. RESULTADOS

- El SFVM usa los cambios de presión de gas rápidos en una cámara de vórtice para romper partículas de material a lo largo de sus puntos estructurales débiles y, de ese modo, crear polvos súper finos. En esencia, el molino se ha diseñado para proporcionar una pulverización fina de polvo eficiente, que ahorra energía, usando una energía relativamente baja, es decir, la energía invertida para pulverizar un kg de polvo es mucho menor que la energía utilizada para pulverizar la misma cantidad de polvo mediante molinos por chorro convencionales o molienda mecánica (cuchillas o bolas) alcanzando al mismo tiempo el mismo tamaño de partícula (véase la Tabla 1).

Tabla 1: Comparación entre un molino de chorro y SFVM (nótese la diferencia en el consumo de energía)

Molino	Flujo de aire requerido (m ³ /min)	Caída de presión (bares)	Velocidad de alimentación (kg/hora)	Kw x hora/kg	Kcal/kg
Molino por chorro	2,84	7	20	2,360	2,029
Molino de vórtice superfino	1,3	4	25,6	0,483	415

El diseño del SFVM permite un ajuste flexible del tamaño de partícula y la distribución del tamaño mediante la variación de los siguientes parámetros:

- La presión de entrada, que aumenta la presión aplicada a la entrada de la cámara del molino principal, aumentaría la energía infligida por unidad de polvo, aumentando de este modo la desintegración de las partículas lo que conduciría a la disminución del tamaño de partícula y estrechar la distribución. Sin embargo, la alta energía puede conducir a una reducción en la actividad biológica del producto pulverizado final.

Hay dos parámetros adicionales que controlan la velocidad de carga del producto dentro del molino:

- (1) La velocidad a la que el producto se vierte en el embudo de recepción del molino
- (2) La presión del inyector.

Una alta velocidad de carga disminuiría la energía por kg de producto, por tanto la energía absorbida por las partículas sería menor, dando como resultado un menor número de desintegraciones de partículas que conducirían a partículas más grandes. En la mayoría de los siguientes experimentos, la presión del inyector se fijó constantemente a 2 bares, lo que fue suficiente para impulsar el producto dentro de la cámara de vórtice en cualquier velocidad de alimentación investigada. Sin embargo, hubo una excepción a la regla anterior, cuando la presión de entrada principal fue alta, > 3 bares, el gas inyectado en el SFVM principal produjo un vacío que succionó las partículas de polvo liofilizado grandes en el molino. Por tanto, la entrada de inyección auxiliar es necesaria cuando se trabaja a presiones inferiores a 3 bares.

Efecto de los parámetros de molienda

- Estos experimentos se realizaron, usando aire comprimido a un punto de rocío de 40 °C con temperatura o humedad

no controladas.

Los polvos de fibrinógeno2 y trombina humanos se enviaron al sitio de ensayo en el Lyoguard envuelto en papel de aluminio. Las tortas liofilizadas se trituraron en partículas pequeñas que se pasaron a través de un tamiz SS de 2 mm, usando una espátula grande. Se cargaron 50 g de cada en el embudo del SFVM. A presión de aire baja, se añadió un medidor de presión auxiliar al orificio del embudo puesto que la succión en el orificio del embudo era demasiado baja para sostener una carga constante.

1. Efecto de los parámetros de molienda sobre el fibrinógeno2 humano

La Tabla 2 presenta los resultados obtenidos cuando el fibrinógeno2 humano liofilizado se molió a diversas presiones de aire y diferentes velocidades de carga.

Tabla 2 Molienda de fibrinógeno2 humano liofilizado a diversas presiones de aire.

Ejecución N.º	Presión sobre el molino (bares)	Presión sobre el Inyector (bares)	Velocidad de carga (kg/hora)	D(50), (µm)	D(90), (µm)	Flujo de aire**, (m³/hora)
Experimento N.º 1						
1	6	0	0,6	4,6	8,8	90
2	3	0	0,2	4,7	8,7	58
3	3	2	2,8	10,7	30,8	69
4	1	2	3,7	43,8	87,2	35
5	2	2	2,4	NR*	NR	50
Experimento N.º 2						
1	2	2	4,2	23,1	50,7	50
2	2	2	3,0	17,5	42	50
3	6,3	0	0,4	4,3	8	90

* NR = No realizado
 ** Flujo de aire usando aire secado al punto de rocío de 40 °C

Todas las curvas de distribución del tamaño de partícula (véase la Figura 1) mostraron una curva de picos bifásica con un pico pequeño a 0,5 a 1 µm y un pico principal a aproximadamente 10-30 µm. Se puede observar a partir de la Tabla 2 que solo las ejecuciones N.º 1 y 2 realizadas en el Experimento 2 tuvieron distribuciones de tamaño similares a las del fibrinógeno2 humano molido a mano (véase la Tabla 2 y la Figura 1). Además, como se representa en la Tabla 3 (Experimento N.º 2, ejecuciones 1 y 2), las mayores recuperaciones de fibrinógeno medidas ya sea por Clauss o por fibrinógeno coagulable (A₂₈₀), se consiguieron cuando los principales parámetros se fijaron a una presión de 2 bares y las velocidades de carga de entre 3 y 4,2 kg/hora.

Tabla 3: Efecto de diversas condiciones de molienda sobre el contenido de agua y la actividad de fibrinógeno del fibrinógeno humano.

Ejecución N.º	Presión sobre el molino (bares)	Presión sobre el Inyector (bares)	Velocidad de carga (kg/hora)	Contenido de agua (%)	Fibrinógeno (Clauss) (mg/mg de sólidos)	Proteína total (mg/mg de sólido)	Fibr.Coag. * (mg/mg de sólido)
Experimento N.º 1							
1	6	0	0,6	5,34	0,24	0,57	0,35
2	3	0	0,2	NR	NR	NR	NR
3	3	2	2,8	NR	NR	NR	NR
4	1	2	3,7	NR	NR	NR	NR
5	2	2	2,4	4,96	0,35	0,68	0,36
Experimento N.º 2							
1	2	2	4,2	5,76	0,35	0,67	0,44
2	2	2	3,0	6,13	0,33	0,64	0,44
3	6,3	0	0,4	5,28	0,22	0,58	0,32

* Fibrinógeno coagulable realizado mediante el procedimiento de A₂₈₀ nm.

2. Efecto de los parámetros de molienda sobre el polvo de trombina

Como se encontró en los primeros experimentos cuando se usó un molino de chorro convencional, la actividad de trombina fue relativamente insensible a la cizalla mecánica y, por consiguiente, se encontró que la trombina era insensible a parámetros de molienda cuando se usa el SFVM. Por tanto el principal objetivo fue encontrar las condiciones en las que la distribución del tamaño de partícula de trombina diera como resultado una distribución

similar a la del fibrinógeno humano. También se tuvo en consideración el deseo de obtener una distribución de tamaño de partícula que se asemejara a la trombina molida a mano. Se puso de manifiesto en el curso de los experimentos anteriores que el polvo de trombina es muy higroscópico. El polvo de trombina molido fino tiene una alta tendencia a captar humedad. Por tanto, a menor tamaño de partícula, más rápido es el aumento en contenido de agua del polvo de trombina. Todos lo anterior apoya el diseño de un procedimiento que conseguirá un tamaño grande de partícula de trombina. Sin embargo, este tamaño no debe exceder el tamaño del fibrinógeno humano de modo que ambos productos tendrán las mismas características de suspensión en HFE-7000.

Tabla 4: Efecto de los parámetros de molienda sobre la distribución del tamaño de partícula de la trombina

Ejecución N.º	Presión sobre el molino (bares)	Presión sobre el Inyector* (bares)	Velocidad de carga (kg/hora)	D(50), µm	D(90), µm	Flujo de aire, m³/hora
4	6	N.A.	2,7	6,1	12,8	90
5	2	N.A.	1,6	10,7	29,7	40

* No se usó ningún inyector.

Puede observarse a partir de la Tabla 4 que la distribución de tamaño obtenida para la trombina cuando se usó baja presión dio como resultado un tamaño de partícula grande y una distribución de tamaño que era bastante similar a la del fibrinógeno humano (véase la Figura 1).

De esta etapa en adelante, toda la molienda a gran escala sistemática tanto para el fibrinógeno humano como para la trombina usando el prototipo 1 de SFVM se dirigió a los mismos parámetros: 2 bares en la entrada principal del molino, 2 bares en el inyector y una velocidad de carga de 2 kg/hora.

El prototipo se volvió a someter a ensayo de nuevo en la instalación de fabricación real usando nitrógeno y operado en la campana de flujo laminar.

3. Ensayo de la molienda de fibrinógeno humano

Durante la molienda del fibrinógeno humano, la humedad en la campana de flujo laminar fue del 22 % y la temperatura, de 22 °C. Todos los procedimientos de fabricación se realizaron asépticamente, donde la velocidad de carga se dirigió hacia a 2 kg/hora y la velocidad del inyector se fijó a 2 bares. El fibrinógeno humano molido se almacenó en recipientes de vidrio a 2-8 °C hasta el ensayo.

Se sometieron a la molienda dos lotes: el lote n.º 1 se usó para la molienda a 2 bares con una actividad inicial antes de la molienda de 0,30-0,31 mg de fibrinógeno por mg de sólidos (el fibrinógeno se midió mediante el procedimiento de Clauss) y el lote n.º 2, con una actividad inicial estimada de 0,35 mg/mg (fibrinógeno/sólidos), se usó para experimentos de molienda a presiones de 1 y 3 bares.

El contenido promedio de agua fue del $9,31 \pm 0,59$ % (medido en el lote n.º 1) una vez que el polvo se trituró en partículas de 2 µm. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Efecto de la presión de molienda de nitrógeno sobre el fibrinógeno coagulable (mediante Clauss) y la distribución de tamaño de partícula del fibrinógeno humano molido en el sitio de fabricación.

Presión de molienda (bares)	Clauss (mg/mg de sólidos)	Tamaño de partícula (D50) (µm)	Tamaño de partícula (D90) (µm)
1	0,36	20,4	39,1
2 (promedio de n = 5)	$0,30 \pm 0,01$	$16,6 \pm 1,0$	$38,4 \pm 1,7$
3	0,32	10,4	28,1

Después de la molienda, el contenido de agua era significativamente menor ($6,66 \pm 0,57$ %), lo que indica que el procedimiento de molienda también seca el polvo. El perfil de distribución de partículas cambió significativamente con la presión (véase la Tabla 5 - Tamaño de partícula D50 y la Figura 2), sin embargo, la molienda a 1 bar todavía produjo una curva de distribución estrecha similar a la de la molienda a mano (comparar las figuras 1 y 2). Además, como puede observarse en la Tabla 5, las presiones entre 1 y 3 y 3 bares no cambiaron significativamente el fibrinógeno coagulable medido mediante Clauss.

4. Ensayo de la molienda de trombina

Durante la molienda de trombina, la humedad y la temperatura en el flujo laminar fue del 26 % y de 21 °C, respectivamente. Todo el procedimiento de fabricación se realizó en condiciones asépticas. La velocidad de alimentación de las partículas de 2 mm se dirigió a 2 kg/hora y la velocidad de inyector se fijó a 2 bares. La trombina molida se almacenó en recipientes de vidrio a 2-8 °C hasta el ensayo.

Se sometieron a molienda dos lotes: el lote n.º 3 se usó para la molienda a 2 bares. Su actividad inicial de trombina antes de la molienda era de $25,85 \pm 0,21$ UI/mg de sólidos. El contenido medio de agua era del $6,08 \pm 0,42$ %, medido en las partículas trituradas de 2 mm. El lote n.º 2 se usó para los experimentos de molienda a presiones de 1 y 4 bares. El contenido de agua se redujo con independencia de la presión una vez que el polvo se molió con nitrógeno seco. Los resultados muestran que las presiones hasta 4 bares no cambiaron la actividad de la trombina.

Tabla 6: Efecto de la presión de millones de nitrógeno sobre la actividad de la trombina y la distribución de tamaño de partículas de trombina molida en el sitio de fabricación.

Presión de molienda (bares)	Contenido de agua (%)	Tamaño de partícula (D50) (µm)	Tamaño de partícula (D90) (µm)	Actividad de trombina (UI/mg)
1	4,35	13,0	33,6	19,7
Promedio de 2 (n = 6)	4,19 + 0,62	10,4 ± 1,4	17,5 ± 3,0	24,6 + 1,9
4	4,07	9,2	15,6	20,3

También ha de observarse que el aumento de la presión de 2 a 4 bares tuvo solamente un ligero efecto sobre la distribución de tamaño de partícula (véanse la Tabla 6 y la Figura 3).

5. Ensayo de la repetibilidad de la molienda, procedimiento usando diversos lotes de fibrinógeno2 humano

Los experimentos anteriores implicaron la alimentación del SFVM con una sucesión ininterrumpida de bandejas LyoGuard® al tiempo que se mantenía la misma presión de entrada principal, la misma presión de inyección y la misma velocidad de carga. Se concibió que el mantenimiento de las mismas condiciones de molienda daría como resultado un producto comparable, un polvo con la misma humedad, la misma distribución de tamaño y las mismas características de coagulación. La comparación de dos lotes de fibrinógeno2 humano cada uno sometido a varias sesiones de molienda sometió a ensayo esta noción.

Se molieron por separado siete bandejas LyoGuard®, que se originaron a partir de dos lotes de fibrinógeno2 humano, en el SFVM. La humedad relativa en la campana laminar de molienda era del 33 % y la temperatura ambiente era de 22 °C.

El contenido de agua de las tortas liofilizadas molidas previamente fue similar, del 5,48 % y del 5,45 % para el lote n.º 4 y n.º 5, respectivamente. La proteína total de la torta liofilizada fue casi idéntica: 0,69 y 0,68 mg de proteína por mg de sólido liofilizado en el lote n.º 4 y n.º 5, respectivamente. Los valores de fibrinógeno coagulable también fueron muy similares con 0,41 y 0,42 mg/mg de sólidos mediante el ensayo de fibrinógeno coagulable ($A_{280\text{ nm}}$), en el lote n.º 4 y n.º 5, respectivamente y 0,35 y 0,32 mg/mg de sólidos mediante el ensayo de Clauss. Después de la molienda, solo hubo una pequeña reducción en el fibrinógeno en un promedio del 6 % (a 0,39 mg/mg de sólidos) como se midió por $A_{280\text{ nm}}$ o en un 20 % y un 6 % (a 0,28 y 0,30 mg/mg de sólidos) como se midió mediante el procedimiento de Clauss, en el lote n.º 4 y n.º 5, respectivamente (Tabla 7 y Figura 4). No se observó ningún cambio en la humedad ni en el contenido de proteína total en ninguno de los lotes (Tabla 7).

Tabla 7: Reproducibilidad de dos lotes de fibrinógeno2 humano (n.º 4 y n.º 5) molidos en serie en el mismo día y en las mismas condiciones de molienda.

Lote n.º	Contenido de agua (%)	Proteína total (mg/mg de sólidos)	Fib. coagulable (mg/mg de sólidos)	Fib. por Clauss (mg/mg de sólidos)	Tamaño de partícula (D50/D90) (µm)
4	6,48	0,67	0,39	0,28	15,0/35,9
4	4,51	0,68	0,39	0,28	17,8/38,6
Promedio	5,50	0,68	0,39	0,28	16,4*/37,3**
DT	1,39	0,01	0,00	0,00	2,0/1,9
5	6,83	0,67	0,39	0,32	20,4/41,8
5	4,98	0,67	0,4	0,3	19,3/39,5
5	5,25	0,67	0,38	0,29	16,8/39,0
5	5,42	0,69	0,4	0,29	21,4/44,2
5	6,19	0,67	0,39	0,3	17,4/41,3
Promedio	5,73	0,67	0,39	0,30	19,1*/41,2**
DT	0,68	0,01	0,01	0,01	1,9/2,1

* Ensayo de T de Student para D50- p = 0,16
 * Ensayo de T de Student para D90- p = 0,07

Aunque la distribución de partículas media como se representa por las curvas de D50/D90 no fue idéntica, 16,4 frente a 19,1 µm y 37,3 frente a 41,2, respectivamente, estas diferencias fueron estadísticamente no significativas (véanse la tabla 7 y la Figura 4).

La repetibilidad se evaluó de nuevo, donde seis bandejas LyoGuard® originadas a partir de dos lotes de fibrinógeno humano (n.º 6 y n.º 7) se molieron en serie (Figura 5 y Tabla 8). La humedad relativa y la temperatura ambiente en la campana laminar de molienda fueron del 18 % y 17 °C, respectivamente.

5 La proteína total de la torta liofilizada fue casi idéntica, 0,65 frente a 0,69 mg de proteína por mg de sólidos liofilizados en el lote n.º 6 y n.º 7, respectivamente. El fibrinógeno coagulable fue esencialmente idéntico, con 0,39 frente a 0,4 mg/mg de sólidos en el lote n.º 6 y n.º 7, respectivamente. Se descubrió una pequeña diferencia entre los dos lotes en la concentración de fibrinógeno medida mediante el procedimiento cinético de Clauss, 0,47 frente a 0,42 en el lote n.º 6 y n.º 7, respectivamente. Dicha variabilidad es muy común en la medición del fibrinógeno mediante el ensayo de Clauss en soluciones de fibrinógeno altamente concentradas. Sin embargo, solo muy raramente las lecturas de fibrinógeno obtenidas mediante el procedimiento de Clauss exceden a la proteína coagulable (A₂₈₀). Después de la molienda, no hubieron cambios en el fibrinógeno coagulable (A₂₈₀ nm) y solo se encontraron pequeñas reducciones de aproximadamente el 11 % y el 5 % en el fibrinógeno medido mediante el procedimiento de Clauss, en los lotes n.º 6 y n.º 7, respectivamente.

15 Además, no se observó ningún cambio ni en el contenido de agua ni en la proteína total en ninguno de los lotes. A pesar de que los promedios de ambos D50/D90 no fueron idénticos en los dos lotes, 17,9 frente a 18,9 µm y 41,5 frente a 42,3 µm, en el lote n.º 6 y n.º 7, respectivamente, los resultados de la distribución de tamaño fueron estadísticamente idénticos, P > 95 % (véanse la Tabla 8 y la Figura 5).

Tabla 8: Reproducibilidad de dos lotes de fibrinógeno humano (lote n.º 6 y n.º 7) molidos en serie en el mismo día y por las mismas condiciones de molienda.

Lote n.º	Contenido de agua (%)	Proteína total (mg/mg de sólidos)	Fib. coagulable (mg/mg de sólidos)	Fib. por Clauss (mg/mg de sólidos)	Tamaño de partícula (D50/D90) (µm)
6	3,80	0,65	0,39	0,44	18,7/42,1
6	3,30	0,67	0,39	0,40	17,0/40,9
Promedio	3,55	0,66	0,39	0,42	17,9/41,5
DT	0,35	0,01	0,00	0,03	1,2/0,9
7	3,70	0,70	0,40	0,41	18,7/40,5
7	3,80	0,69	0,39	0,41	17,6/38,5
7	3,70	0,69	0,40	0,40	19,4/46,7
7	3,70	0,68	0,40	0,38	19,9/43,4
Promedio	3,73	0,69	0,40	0,40	18,9/42,3
DT	0,05	0,01	0,01	0,01	1,0/3,6

20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de micronización de una dispersión de partículas de proteína o de una dispersión de partículas que comprenden una proteína, teniendo la proteína un nivel predeterminado de actividad biológica, **caracterizado porque** el procedimiento comprende:
- 5 la introducción de la dispersión en un aparato de molienda de cámara de vórtice que comprende boquillas de inyección de fluido tangenciales que realiza la molienda de torbellino por resonancia usando gradientes de presión; y la molienda de la dispersión en condiciones de molienda que comprenden una presión de entrada en el intervalo de 1 a 7 bares, una velocidad de carga en el intervalo de 0,1 a 5 kg/hora y un flujo de gas en el intervalo de 30 a 100 m³/hora y, opcionalmente, una presión del inyector en el intervalo de 0,2 a 5 bares,
- 10 obteniéndose de este modo un polvo de proteína que conserva al menos el 80 % del nivel predeterminado de actividad biológica y tiene una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 5 a 100 µm o que presenta una reducción de 30 a 400 veces del tamaño original de las partículas en la dispersión.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las partículas en la dispersión tienen grietas o cavidades.
- 15 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la dispersión se prepara mediante un procedimiento de secado por congelación.
4. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende adicionalmente la trituración mecánica de la dispersión antes de la molienda.
- 20 5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteína es una enzima y la actividad biológica es su actividad enzimática.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteína es un factor de coagulación y la actividad biológica es su actividad de coagulación.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cámara de vórtice de molienda está contenida dentro de un Super Fine Vortex Mill™ (SFVM).
- 25 8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la distribución del tamaño de partícula es de 10 a 100 µm.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que al menos el 90 % de las partículas después de la molienda están dentro de la distribución del tamaño de partícula.
- 30 10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el polvo de proteína conserva al menos el 90 % de la actividad biológica predeterminada.
- 35 11. Un procedimiento de micronización de una dispersión de partículas de proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las condiciones de molienda comprenden una presión de entrada de 2 bares, una presión del inyector de 2 bares, una velocidad de carga en el intervalo de 2 a 5 kg/hora, aproximadamente 1,6, 2, 2,7, 3 o 4,2 kg/hora y un flujo de gas en el intervalo de 30 a 100 m³/hora, obteniéndose de este modo un polvo de proteína que tiene una distribución de tamaño de partícula de 10 a 60 µm y que conserva al menos el 90 % del nivel predeterminado de actividad biológica.
- 40 12. Un procedimiento de micronización de una dispersión de partículas de proteína de acuerdo con la reivindicación 1 en el que las condiciones de molienda comprenden una presión de entrada de 2 bares, una presión del inyector de 2 bares, una velocidad de carga en el intervalo de 2 a 5 kg/hora, aproximadamente 1,6, 2, 2,7, 3 o 4,2 kg/hora y un flujo de gas en el intervalo de 30 a 100 m³/hora, obteniéndose de este modo un polvo de proteína que presenta una reducción de 30 a 400 veces del tamaño original de la dispersión de partículas de proteína y que conserva al menos el 90 % del nivel predeterminado de actividad biológica.
- 45 13. Un procedimiento de micronización de una dispersión de partículas de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las condiciones de molienda comprenden una presión de entrada en el intervalo de 1 a 4 bares, una velocidad de carga en el intervalo de 1 a 5 kg/hora, un flujo de gas en el intervalo de 30 a 100 m³/hora y, opcionalmente, una presión del inyector de 2 bares.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que las condiciones de molienda comprenden una presión del inyector de 2 bares.

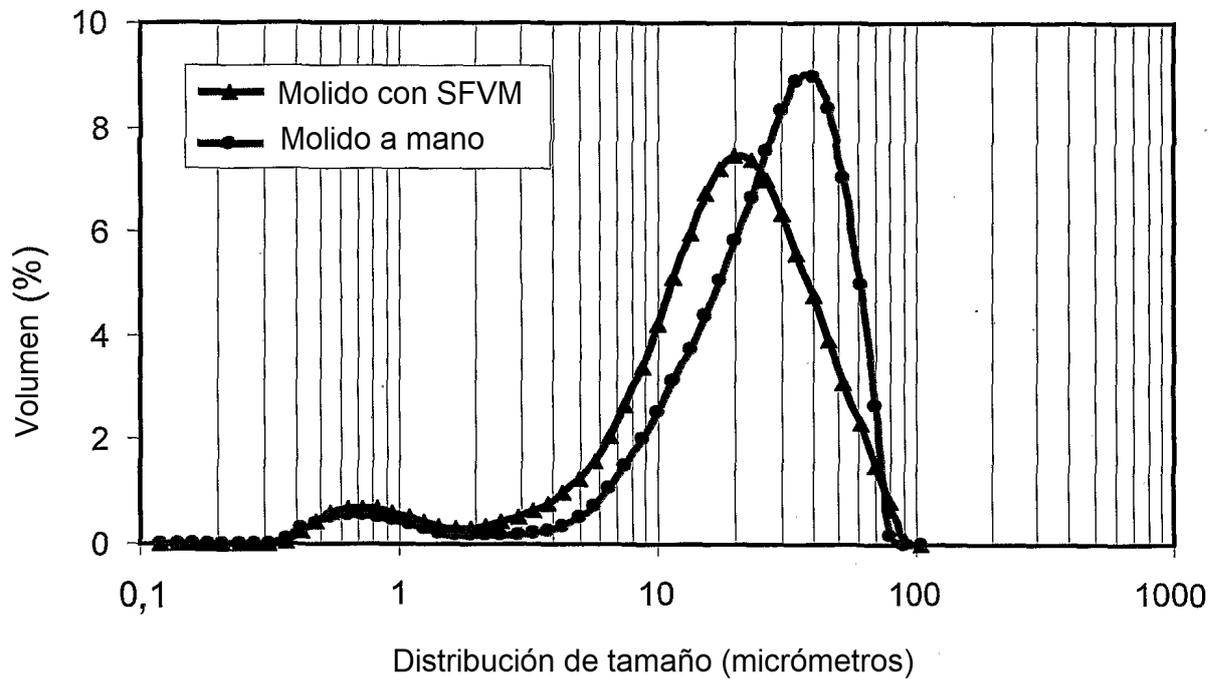


FIG. 1

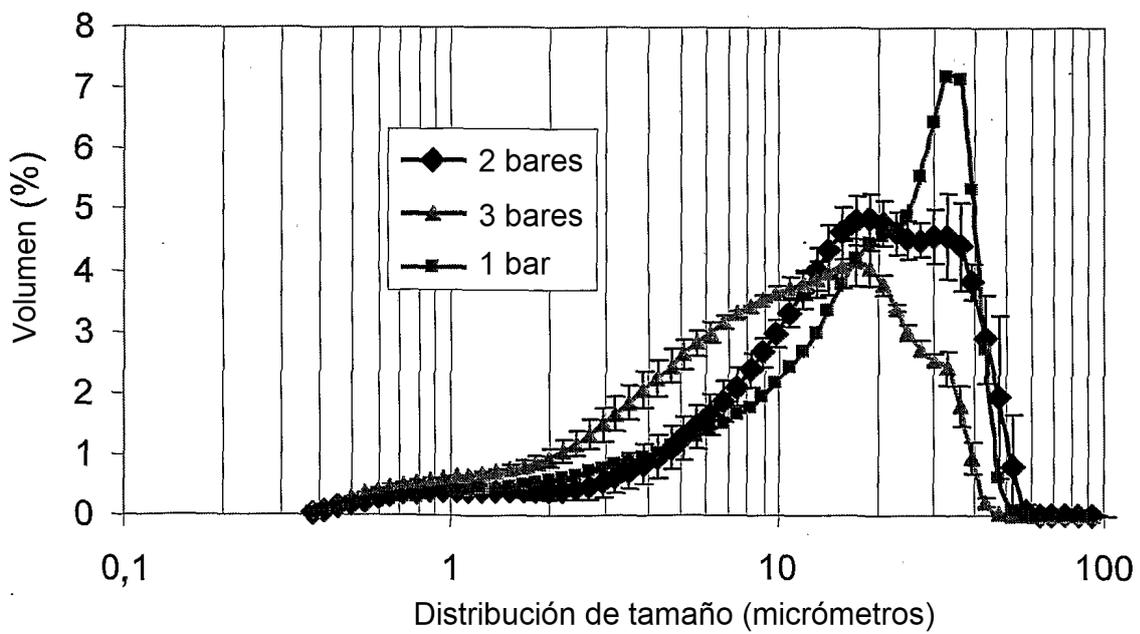


FIG. 2

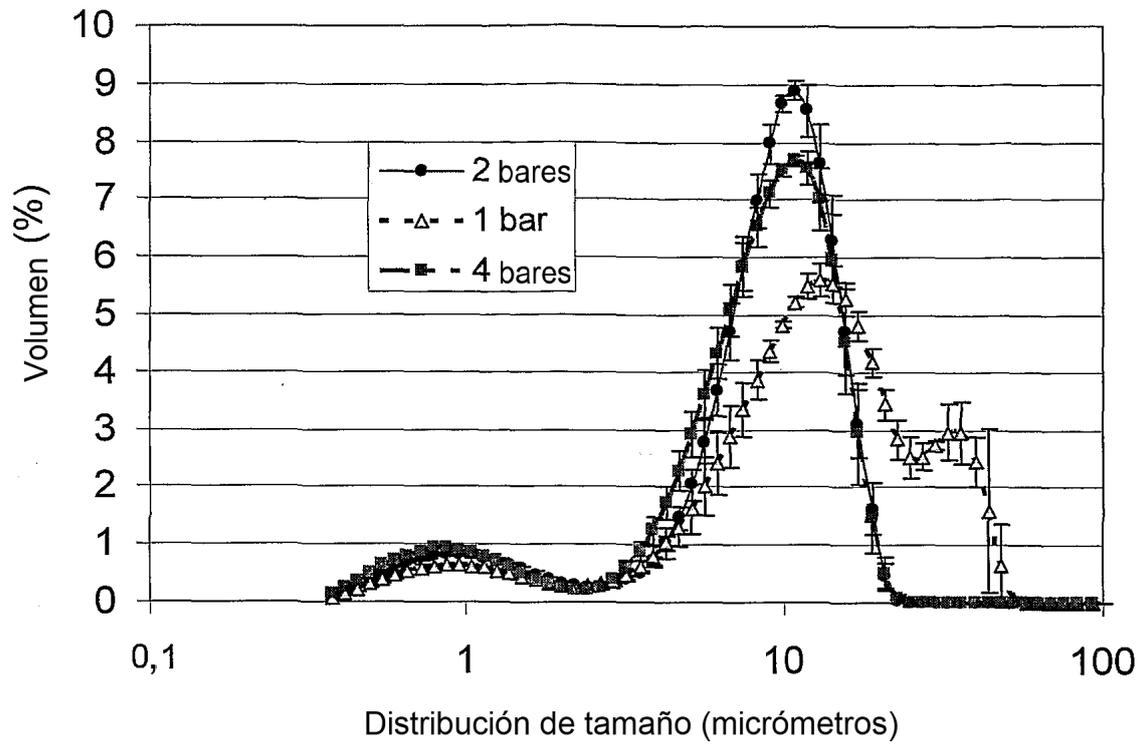


FIG. 3

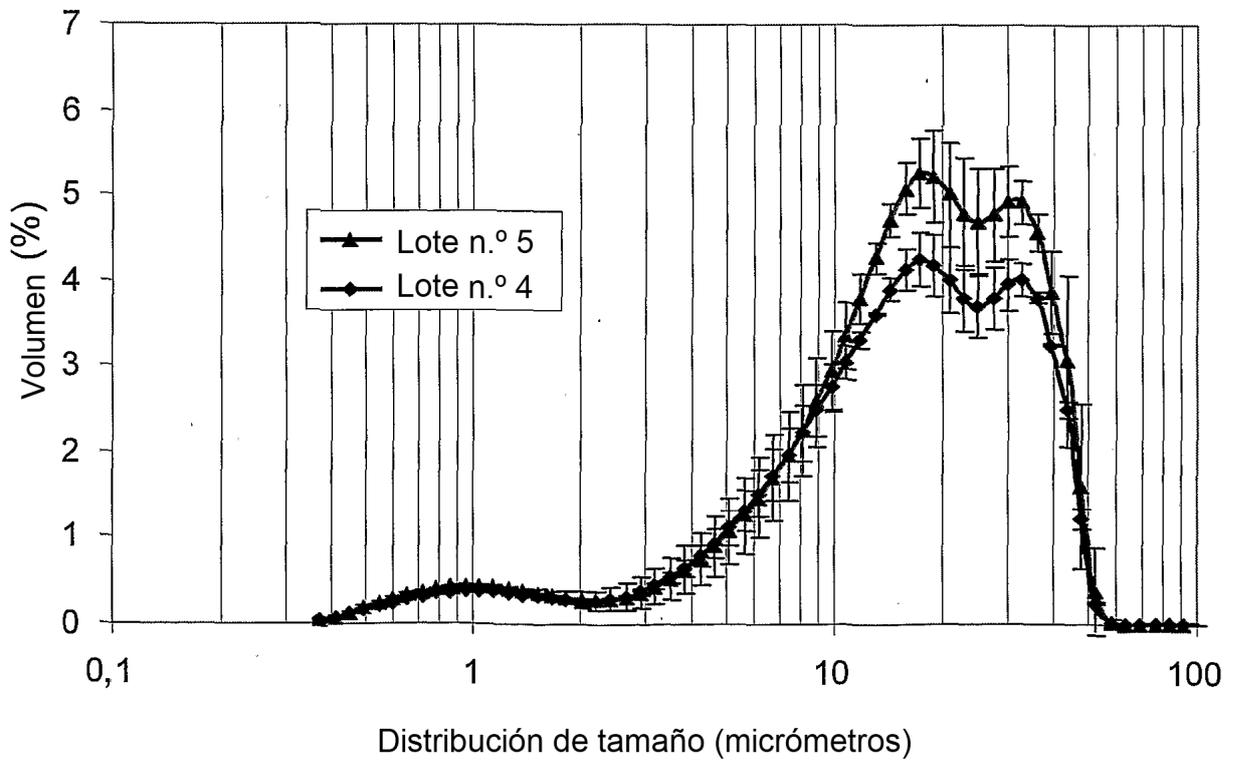


FIG. 4

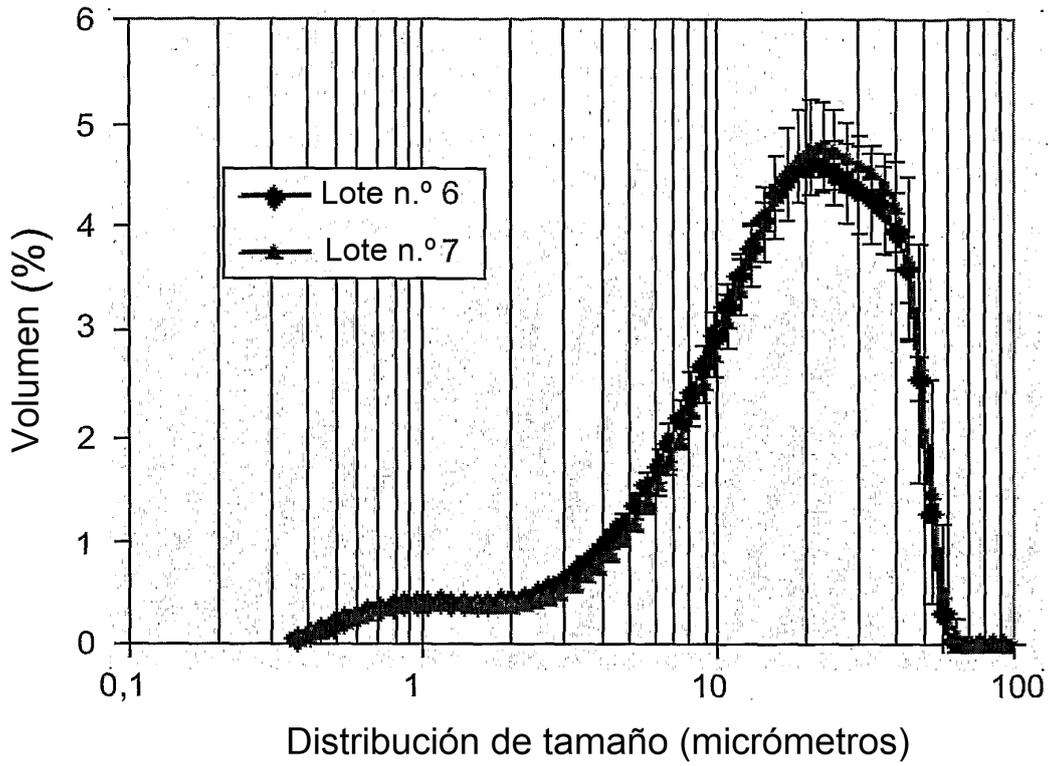


FIG. 5

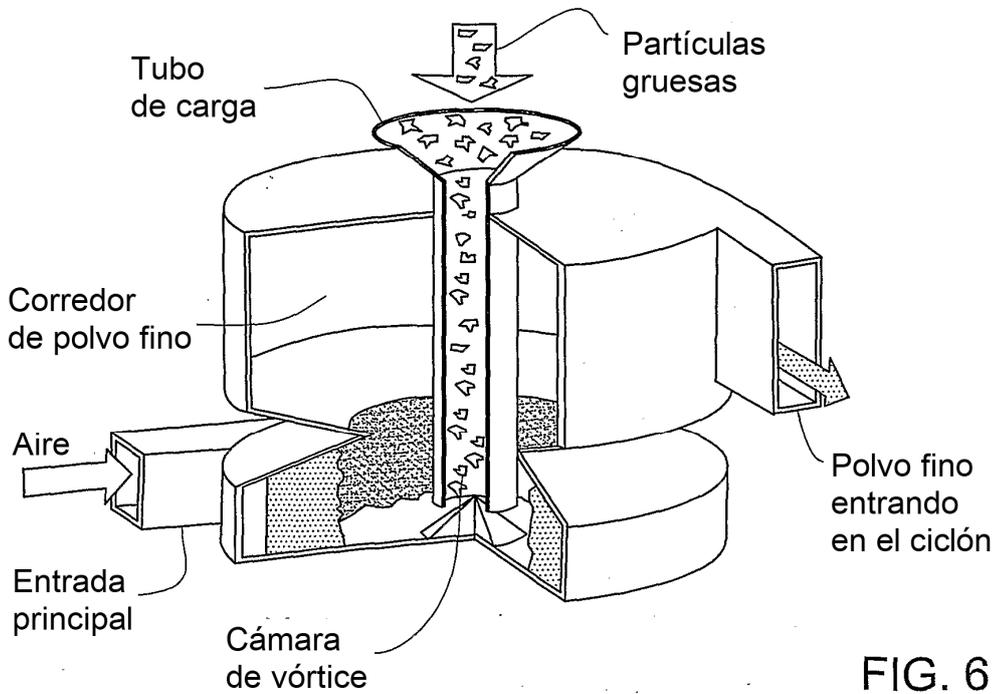


FIG. 6