

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 312**

51 Int. Cl.:

A61L 24/10 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
A61L 24/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2001** E 01103992 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017** EP 1136084

54 Título: **Preparados de trombina y un procedimiento para su producción**

30 Prioridad:

18.03.2000 DE 10012732

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

13.02.2018

73 Titular/es:

**CSL BEHRING GMBH (100.0%)
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

**METZNER, HUBERT y
SCHNEIDER, HEINRICH**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 654 312 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

Preparados de trombina y un procedimiento para su producción

5 El objeto del invento es un preparado de trombina que es estable en el estado líquido, que se distingue por unas altas pureza y seguridad frente a infestaciones víricas, así como un procedimiento para su producción.

Desde que se hubo conseguido producir comercialmente una trombina, han resultado varias utilizaciones para ésta. Como utilizaciones principales, junto a finalidades de diagnóstico, se ha de mencionar actualmente el empleo como agente hemostático local o como componente de un pegamento tisular, en común con un componente que contiene fibrinógeno. La premisa para el empleo de una trombina para finalidades médicas es que ella debe de poder ser puesta a disposición de los médicos en forma de un preparado estable, que ha de tener una alta seguridad frente a infestaciones víricas, y que a ser posible no ha de contener ningún ineficaz producto secundario o de degradación de la trombina ni de otros factores.

15 Ya se han propuesto numerosos métodos para la estabilización de una trombina. Así, a partir de la solicitud de patente japonesa nº 57-39782 se conoce un procedimiento, en el que se emplean unos ácidos mono- o policarboxílicos y/o unos ácidos mono- o polihidroxicarboxílicos orgánicos para la producción de unas soluciones acuosas estables de trombina. A partir de la solicitud de patente japonesa nº 57-18985 se conoce una albúmina como agente estabilizador de trombina, y a partir de la solicitud de patente japonesa nº 62-106028 se conoce una solución tamponadora como agente estabilizador. En la solicitud de patente europea 0 302 754 se proponen un azúcar y un aminoácido, de manera preferida en una concentración de 1 a 10 % en peso, como agentes estabilizadores para unas soluciones de trombina.

25 Por lo demás, a partir del documento de publicación de solicitud de patente alemana 31 22 926 se conoce un preparado de trombina almacenable, que describe, junto a cloruro de sodio, unos alcoholes plurivalentes con 3 hasta 6 átomos de carbono, unos aminoácidos exentos de azufre y un poli(etilenglicol) para la producción de unas soluciones de trombina. Finalmente, también en la solicitud de patente europea 0 221 700 se describe un preparado de trombina tamponado a un valor del pH de 5 a 8, que puede contener cloruro de sodio y un compuesto polihidroxílico.

Unas soluciones de trombina tamponadas y estabilizadas se conocen también a partir de una publicación de J. Chabbat y colaboradores [J. Chabbat, M. Tellier, P. Porte y M. Steinbuch: Properties of a new fibrin glue stable in liquid state. *Thromb. Res.* 76: 525-533 (1994)].

35 Además de esto, también en una publicación de D.V. Brezniak, H.I. Hassouna y J.W Fenton II [Blood Coagulation and Fibrinolysis, 6, 847-848 (1994)] ya se ha descrito la influencia de ciertas sales sobre la estabilidad de unas soluciones diluidas de α -trombina. En el presente caso, se puso de manifiesto que en soluciones diluidas de trombina unas concentraciones de cloruro de sodio a partir de 0,3 mol/l dan lugar a una manifiesta estabilización. Según esto, la trombina debe de ser estable a 37°C durante aproximadamente 2 semanas en unas soluciones que contienen cloruro de sodio, y por consiguiente debe tener una estabilidad más alta que en unas soluciones que contienen cloruro de calcio, lo que se puede explicar posiblemente por una mejor estabilidad térmica frente a una desnaturalización.

45 En numerosas solicitudes de patentes también se han descrito ya unos procedimientos para la producción de unos preparados altamente purificados de trombina. Así, a partir de la solicitud de patente europea 0 439 156 se conoce un procedimiento para la producción de una trombina purificada con una actividad específica mayor que 1.600 U/mg, que se puede emplear para la hemóstasis. En el presente caso, se utiliza una tromboplastina para la activación de la protrombina, y se emplean una cromatografía por intercambio de aniones y una cromatografía por intercambio de cationes con unos materiales de soporte basados en agarosa. En el documento de patente de los EE.UU. 5 397 704 se describe una trombina de procedencia bovina, "ultra-pura", transparente, incolora, que tiene una actividad específica de aproximadamente 8.000 hasta 11.000 NIH U/mg. Para la activación de la protrombina se emplea allí una tromboplastina de pulmón bovino, y para la purificación de las proteínas se utilizan una cromatografía por intercambio de aniones y una cromatografía por intercambio de cationes.

55 Sin embargo, ninguno de los procedimientos conocidos hasta ahora permite la producción de un preparado de trombina purificado, que contenga iones de calcio, que sea seguro frente a la infestación vírica y que sea estable en el estado líquido a 0°C y a unas temperaturas más altas, cuya actividad de trombina, después de 12 meses y más, esté situada todavía por encima de 70-80 % del valor de partida. Por lo tanto, se ha establecido la misión de desarrollar un procedimiento para la producción de un tal preparado de trombina, debiéndose prescindir de la utilización de tromboplastina en el caso de la activación de la protrombina por motivos de la seguridad del preparado. Además, subsistía la misión de evitar unas altas concentraciones de polioles como una adición a estabilizador, puesto que debido a éstas se establece un indeseado aumento de la viscosidad de la formulación.

65 Por fin, se ha encontrado que el problema planteado por esta misión se resuelve mediante los objetos que se describen en las reivindicaciones. Un objeto del invento es un procedimiento para la producción de un preparado de

trombina, en cuyo caso se purifica una protrombina obtenida a partir de un plasma o de una fracción de plasma, después de su activación para dar trombina, sin la adición de tromboplastina así como eventualmente después de otras etapas de elaboración, mediante una cromatografía por interacción hidrófoba, y a continuación, eventualmente se desactivan o eliminan los virus.

5 Un mejoramiento adicional de este procedimiento es posible cuando antes o después de la cromatografía por interacción hidrófoba se lleva a cabo adicionalmente todavía una cromatografía por intercambio de cationes. En el presente caso, las cromatografías se pueden llevar a cabo como una cromatografía "positiva" (con una fijación de la trombina) o como una cromatografía "negativa" (con una fijación de las impurezas).

10 Puesto que para la consecución de una alta estabilidad de trombina en el estado líquido es necesaria una suficiente pureza de la solución de trombina empleada, se buscó un procedimiento sencillo y mejorado para producir una trombina muy pura con una alta seguridad frente a la infestación vírica. En el presente caso se puede partir p.ej. del procedimiento descrito en la solicitud de patente europea 0 543 178 para la producción de un concentrado de trombina. Sin embargo, también otros procedimientos, en los que una protrombina parcialmente purificada es activada en presencia de ciertas sales de calcio para dar una trombina, se pueden emplear conforme al invento como material de partida para la producción del preparado de trombina.

20 Ahora bien, si para la purificación de la trombina se emplea la cromatografía por interacción hidrófoba (HIC) a solas o en combinación con una cromatografía por intercambio de cationes (CEC), entonces se consigue de este modo una eficaz y sencilla purificación. El orden de sucesión de estos procedimientos cromatográficos es arbitrario en el presente caso. Si la cromatografía se lleva a cabo primeramente con un soporte hidrófobo, el material eluido con trombina se puede fijar a continuación directamente al intercambiador de cationes y puede ser eluido allí por medio de un gradiente de sales. Mediante una combinación de estos dos principios de separación, en el caso de un buen rendimiento de aproximadamente 70 %, a través de ambas etapas de purificación se obtiene un preparado de trombina con alta pureza.

25 Simultáneamente, en este contexto se consigue también una buena separación de productos secundarios tales como factores de coagulación activados o no activados, y de unas formas de la trombina poco o nada activas en el ensayo de coagulación (p.ej. protrombina, β -trombina, γ -trombina u otros fragmentos de trombina o protrombina). La combinación de los dos procedimientos cromatográficos mencionados proporciona una pureza más alta que la utilización a solas de una cromatografía por intercambio de iones.

35 El procedimiento de producción conforme al invento se lleva a cabo de tal manera que primeramente se prepara una trombina con una pureza pequeña o mediana. Esto se puede efectuar de tal manera que la adsorción de protrombina a partir de un plasma o de una fracción de plasma se realiza en un intercambiador de iones. La protrombina obtenida de esta manera se puede someter luego a una desactivación de los virus, p.ej. mediante una pasterización u otro método conocido, y eventualmente a otras etapas de elaboración adicionales, y luego la trombina se puede activar según unos procedimientos en sí conocidos sin la adición de una tromboplastina obtenida a partir de un tejido animal. Con la cromatografía por interacción hidrófoba que sigue a continuación se alcanza un empobrecimiento en cuanto a proteínas plasmáticas acompañantes, factores activados o sus fragmentos, así como en cuanto a los productos de disociación de la trombina. Este efecto de purificación es reforzado ulteriormente mediante la cromatografía por intercambio de cationes conectada a continuación.

40 Después de una elución de la trombina pura, mediante adición de unas sustancias tamponadoras adecuadas, se ajusta luego el valor del pH de la composición a un intervalo de 5 a 8 y se añaden unos agentes estabilizadores. La adición de una o varias sustancia(s) tamponadora(s) y de los agentes estabilizadores se puede efectuar en común.

50 En el caso de la cromatografía por interacción hidrófoba, que es en sí conocida como método cromatográfico, se emplea como adsorbente un gel con radicales hidrófobos acoplados. Unos radicales hidrófobos especialmente apropiados son en el presente caso unos radicales fenilo u otros ligandos con una hidrofobicidad similar.

55 Como intercambiador de cationes se emplea de manera preferida un gel con una alta resolución para las diversas variantes de la trombina. Ejemplos de unos apropiados geles de intercambiadores de cationes son Fractogel EMD SO₃ (Merck, Darmstadt, Alemania), Macro Prep 50S (Biorad, Munich, Alemania) u otros intercambiadores de cationes, que corresponden a los requisitos actuales en lo que respecta a la purificación y esterilizabilidad.

60 La solución de trombina obtenida después de una purificación por cromatografía se puede aportar entonces directamente a una desactivación de virus o a un empobrecimiento en cuanto a virus, tal como p.ej. una filtración a través de membranas de poros pequeños, con lo cual es posible alcanzar una efectiva separación incluso de los virus más pequeños mediando consecución de un alto rendimiento de trombina. No obstante, una desactivación de virus o un empobrecimiento en cuanto a virus de una trombina se puede efectuar también antes de la purificación cromatográfica, en el caso de que de esta manera se facilite el proceso global (p.ej. mediante eliminación de unos componentes o productos secundarios indeseados en la subsiguiente cromatografía).

65 Para la formulación del preparado de trombina como un componente almacenable y estable en el estado líquido y eventualmente también en el estado congelado, para el empleo en un pegamento tisular o a solas como un agente

hemostático local, se debería ajustar un valor del pH de aproximadamente 5,0 a 8,0 con ayuda de un tampón. Para la consecución del efecto deseado en el caso del uso o respectivamente para la estabilización, se le añaden entonces al preparado una sal soluble de calcio, cloruro de sodio, un azúcar o un azúcar-alcohol y/o un aminoácido, o también la sal de un ácido mono- o policarboxílico y/o la sal de un ácido mono- o polihidroxicarboxílico. De esta manera resultan unas buenas estabilidades en el estado líquido y/o congelado durante un período de tiempo de almacenamiento de 12 meses y más tiempo.

También se ha puesto de manifiesto que mediante adición de unas sustancias que inhiben la actividad de la trombina in vitro no covalentemente, se puede aumentar la estabilidad sobre todo a la temperatura ambiente de una manera todavía más significativa, mediante el recurso de que se hace retroceder la autólisis de la trombina. Unas sustancias apropiadas para esto son unos compuestos tales como benzamidina o p-amino-benzamidina u otros agentes inhibidores de proteasas con una afinidad baja o mediana. Mediante la adición de estos inhibidores de baja o mediana afinidad no se perjudica esencialmente la actividad de la trombina frente a unas sustancias tales como el fibrinógeno, y de esta manera tampoco se perjudica p.ej. el empleo posterior como componente de un pegamento tisular.

Con los procedimientos conformes al invento se pueden producir unos preparados de trombina, que se pueden almacenar en el estado líquido y/o congelado durante meses o años, y cuya actividad no disminuye en este período de tiempo por debajo de 70-80 %.

Con los procedimientos conformes al invento es posible producir unas preparados de trombina, también en presencia de unas sales de calcio, que disminuyen la estabilidad térmica de la trombina [B.H. Landis, K.A. Koehler y J.W. Fenton II: Human Thrombins. J Biol chem 256: 4604-4610 (1981)], las cuales tienen a 4°C una alta estabilidad hasta durante 24 meses y más, tal como se puede comprobar en el ensayo de coagulación. También en el estado congelado son estables muchos de los preparados de trombina mostrados en la Tabla 4, e incluso a la temperatura ambiente se presenta una estabilidad en la mayoría de los casos durante un período de tiempo de 3 a 6 meses. A la temperatura ambiente se puede aumentar la estabilidad en especial mediante la adición de unos inhibidores de trombina de baja o mediana afinidad, tales como p.ej. benzamidina, p-amino-benzamidina, u otros inhibidores de proteasas o respectivamente de trombina, sin que en tal caso disminuya significativamente la actividad frente al fibrinógeno en el ensayo de coagulación.

Los preparados de trombina producidos de acuerdo con el procedimiento descrito se pueden emplear, entre otras cosas, como componentes de un pegamento de fibrina almacenable en el estado líquido o congelado, que consta de dos componentes, p.ej. de un componente que contiene trombina y de un componente que contiene fibrinógeno, o que consta de tres componentes, p.ej. de un componente que contiene trombina, de uno que contiene fibrinógeno y de uno que contiene el factor XIII, tal como se ha descrito en la solicitud de patente alemana 198 53 033.1. En este contexto, el preparado de trombina producido de esta manera se puede mezclar o bien in situ con los otros componentes o, en el caso de un pegamento de fibrina de 3 componentes, él se puede mezclar también de antemano con uno de los componentes, antes de que ambos se añadan al tercer componente. No obstante, también es posible la producción de unos preparados de trombina liofilizados mediante utilización del procedimiento conforme al invento para finalidades terapéuticas, observándose todavía una estabilidad correspondientemente alta después de una reconstitución al estado líquido.

Finalmente, los concentrados de trombina producidos conforme al invento se pueden emplear a solas o también en combinación con unos materiales de soporte como una sustancia activa para el restañamiento local de la sangre.

El procedimiento conforme al invento se ilustra más detalladamente mediante los siguientes Ejemplos:

Ejemplo 1: Purificación de trombina

Partiendo de un concentrado de trombina con una pureza pequeña o mediana, que se ha producido según unos procedimientos conocidos, se llevaron a cabo dos etapas de cromatografía.

Primeramente, la solución de trombina se mezcló con 0,6 mol/l de sulfato de sodio y se adsorbió en un gel de cromatografía hidrófobo (en el presente caso: Phenyl-Sepharose HP, fabricante: Amersham Pharmacia, Friburgo, Alemania), que se había equilibrado previamente con un tampón A (10 mmol/l de fosfato de Na, de pH 6,5), que contenía 0,6 mol/l de sulfato de sodio. Después de haber lavado con el tampón A, que contenía 0,6 mol/l de sulfato de sodio, la trombina fijada se eluyó mediante un gradiente con un contenido decreciente de sulfato de sodio en el tampón A. Las impurezas y los fragmentos de trombina se separaron en una gran parte en el material que había pasado o en las fracciones lavadas.

La fracción de trombina se añadió sin ningún tratamiento ulterior directamente a una columna intercambiadora de cationes (en el presente caso: Fractogel[®] EMD SO₃, fabricante: Merck, Darmstadt, Alemania) equilibrada con el tampón A, se lavó con el tampón de equilibrado A y se eluyó con ayuda de un gradiente de 0 a 1,0 mol/l de cloruro de sodio en el tampón A. En el transcurso de la separación se separaron los últimos productos secundarios y los fragmentos de trombina, de tal manera que el material eluido con α -trombina que se había obtenido tenía una alta

5 pureza específica de aproximadamente 3.500 UI/mg [la determinación de las proteínas se llevó a cabo mediante determinación de la absorción a 280 nm y conversión por cálculo con el factor de 1,74 para una solución al 0,1 % de acuerdo con J.W. Fenton, II, M.J. Fasco, A.B. Stackrow, D.L. Aronson, A.M. Young, y J.S. Finlayson. Human Thrombins. J Biol Chem 252: 3587-3598 (1977)]. La Tabla 1 muestra los resultados de esta purificación de trombina y la actividad específica obtenida.

En esta etapa la trombina se puede almacenar en el estado enfriado o congelado profundamente hasta su elaboración ulterior.

Tabla 1:

Muestra	Absorción a 280 nm	Proteína* (mg/ml)	Actividad (UI/ml)	Actividad específica (UI/mg)
Trombina, material de partida	13,78	7,92	6.418	810
Material eluido de la HIC	1,085	0,624	1.372	2.199
Material eluido de la CEC	6,65	3,822	13.370	3.498

* $A_{280,0,1\%} = 1,74$

Ejemplo 2: Purificación de trombina

15 Partiendo de un concentrado de trombina, que tenía una pureza mediana o baja, se llevaron a cabo dos etapas de cromatografía. Primeramente, la solución de trombina se mezcló con 0,6 mol/l de sulfato de sodio y se adsorbió en un gel de cromatografía hidrófobo (en el presente caso: Phenyl-Sepharose HP, fabricante: Amersham Pharmacia, Friburgo, Alemania), que se había equilibrado previamente con el tampón B (10 mmol/l de fosfato de Na, 0,1 % de un PEG, de pH 6,5 [en el presente caso se trata del PEG 6000, pero también se pueden emplear otros intervalos de pesos moleculares]), que contenía 0,6 mol/l de sulfato de sodio. Después de haber lavado con el tampón B, que
 20 contenía 0,6 mol/l de sulfato de sodio, la trombina fijada se eluyó con ayuda de un gradiente con un contenido decreciente de sulfato de sodio en el tampón B. Las impurezas y los fragmentos de trombina se separaron en gran parte en el material que había pasado o en las fracciones de lavado.

25 La fracción de trombina se añadió directamente, sin ningún tratamiento ulterior, a una columna intercambiadora de cationes (en el presente caso: Fractogel® EMD SO₃, fabricante: Merck, Darmstadt, Alemania) equilibrada con el tampón C (10 mmol/l de fosfato de Na, 166 mmol/l de L-arginina, de pH 6,5) se lavó con el tampón de equilibrado C y se eluyó con ayuda de un gradiente de 0 a 1,0 mol/l de cloruro de sodio en el tampón C. En el transcurso de la separación se separaron los últimos productos secundarios que estaban todavía presentes y los fragmentos de
 30 trombina, de tal manera que el material eluido obtenido, que contenía α-trombina, tenía una alta pureza específica de aproximadamente 3.300 UI/mg (compárese la Tabla 2).

En esta etapa se puede almacenar la trombina obtenida en el estado enfriado o congelado hasta su elaboración ulterior.

Tabla 2:

Muestra	Absorción a 280 nm	Proteína* (mg/ml)	Actividad (UI/ml)	Actividad específica (UI/mg)
Trombina, material de partida	12,49	7,178	5.895	821
Material eluido de la HIC	2,042	1,174	2.696	2.296
Material eluido de la CEC	8,03	4,615	15.150	3.283

* $A_{280,0,1\%} = 1,74$

Ejemplo 3: Purificación de la trombina

40 Correspondientemente al Ejemplo 1, se llevó a cabo una purificación de la trombina, pero con la diferencia de que el tampón empleado en el caso de la cromatografía contiene 20 mmol/l de L-histidina en lugar de fosfato de sodio. Esta modificación proporciona unos resultados de purificación comparables a los del Ejemplo 1, pero puede facilitar la elaboración ulterior para dar el producto final, cuando en el presente caso deba de estar contenida p.ej. histidina
 45 como sustancia tamponadora.

Ejemplo 4: Purificación de la trombina y filtración

Partiendo de un material eluido que contiene trombina, purificado tal como se ha descrito en los Ejemplos 1 hasta 3, después de una cromatografía por interacción hidrófoba y de una cromatografía por intercambio de cationes, se llevó a cabo una filtración en una membrana con un pequeño tamaño de poros (p.ej. Pianova™ 15 nm). Con ayuda de esta membrana se pueden separar eficazmente incluso unos virus pequeños tales como los parvovirus. Se encontró que en el caso de la utilización de la trombina purificada como material de partida, con una buena tasa de filtración, se obtuvieron unos rendimientos muy buenos en lo que respecta a la actividad de trombina y a las proteínas (véase la Tabla 3). Así, este procedimiento es apropiado para la producción de un concentrado de trombina con unos altos factores de empobrecimiento en cuanto a virus.

Tabla 3: Filtración de 123 ml de trombina purificada a través de un módulo Pianova™ 15 nm (0,001 m²).

Muestra	Actividad de trombina, total	Proteína, total*
antes de la filtración	800.240 UI	245,3 mg
después de la filtración	797.960 UI	239,0 mg
Rendimiento	99,7 %	97,4 %
* A _{280,0,1%} = 1,74		

Ejemplo 5: Preparados de trombina

Partiendo de una trombina purificada por cromatografía, se produjeron diversos preparados y éstos se almacenaron a unas temperaturas de -20°C, 4°C, 20-25°C y parcialmente también a 37°C. La producción de estas soluciones de trombina se efectuó mediante diafiltración de los concentrados purificados de trombina frente al tampón de formulación o mediante diafiltración frente a un tampón de base, y adición de los aditivos restantes, ajuste del valor del pH y ajuste de la concentración de trombina. De esta manera se pueden ajustar unas concentraciones de trombina de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 15.000 UI/ml.

Los preparados se ensayaron en cuanto a su estabilidad mediante determinación de la actividad de trombina en un ensayo de coagulación con fibrinógeno como sustrato. La Tabla 4 muestra una selección de las formulaciones conformes al invento y su composición de agentes estabilizadores y la Tabla 5 muestra los correspondientes datos de la estabilidad hasta a tres temperaturas.

Tabla 4: Composición de los preparados de trombina

1. 360 mmol/l de NaCl, 40 mmol/l de CaCl₂, 5 mmol/l de L-histidina pH 6,0
2. 360 mmol/l de NaCl, 40 mmol/l de CaCl₂, 2 % (p/v) de manitol, 5 mmol/l de L-histidina pH 6,0
3. 150 mmol/l de NaCl, 40 mmol/l de CaCl₂, 2% (p/v) de manitol, 5 mmol/l de L-histidina pH 6,0
4. 90 mmol/l de NaCl, 40 mmol/l de CaCl₂, 100 mmol/l de succinato de Na, 5 mmol/l de L-histidina pH 6,0
5. 90 mmol/l de NaCl, 40 mmol/l de CaCl₂, 100 mmol/l de succinato de Na, 2% (p/v) de manitol, 5 mmol/l de L-histidina pH 6,0
6. 150 mmol/l de NaCl, 40 mmol/l de CaCl₂, 100 mmol/l de succinato de Na, 5 mmol/l de L-histidina pH 6,0
7. 90 mmol/l de NaCl, 40 mmol/l de CaCl₂, 50 mmol/l de lactato de Na, 2% (p/v) de manitol, 5 mmol/l de L-histidina pH 6,0
8. 90 mmol/l de NaCl, 40 mmol/l de CaCl₂, 2% (p/v) de manitol, 10 mmol/l de p-amino-benzamidina, 5 mmol/l de L-histidina pH 6,0
9. 90 mmol/l de NaCl, 40 mmol/l de CaCl₂, 2% (p/v) de manitol, 10 mmol/l de benzamidina, 5 mmol/l de L-histidina pH 6,0
10. 90 mmol/l de NaCl, 40 mmol/l de CaCl₂, 4% (p/v) de HSA, 5 mmol/l de L-histidina pH 6,0
11. 90 mmol/l de NaCl, 40 mmol/l de CaCl₂, 1 % (p/v) de manitol, 142 mmol/l de L-arginina, 5 mmol/l de L-histidina pH 6,0
12. 90 mmol/l de NaCl, 40 mmol/l de CaCl₂, 100 mmol/l succinato de Na, 0,1% de poli(vinilpirrolidona) (K15), 5 mmol/l de L-histidina pH 6,0.

ES 2 654 312 T3

Tabla 5: Estabilidad de la trombina en diversos preparados a 4°C, -20°C y 20-25°C

Actividad de trombina (% del valor cero), temperatura de almacenamiento: 4°C												
Período de tiempo de almacenamiento (meses)	tanda											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	101,5	95,8	98,9	94,0	100,4	100,8	110,6	102	98,0	106,8	108,3	98,0
3	98,9	109,8	103,4	103,1	108,8	104,5	101,6	95,6	91,5	98,5	102,3	103,9
6	100,5	117,5	88,4	97,3	99,0	98,2	108,1	97,6	95,2	103,0	99,4	101,9
9	97,5	112,9	95,6	94,2	91,9	91,6	122,7	102,2	99,6	102,2	91,5	108,0
12	100,2	116,5	93,6	92,4	105,8	106,4	117,2	100,2	97,8	101,2	93,5	103,8
18	89,7	101,7	-	94,7			112,7	-	-	89,2	95,8	104,1
24	100,5		86,8	95,5				100	94,3	89,2	96,2	
Actividad de trombina (% del valor cero), temperatura de almacenamiento: -20°C												
Período de tiempo de almacenamiento (meses)	tanda											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	100		100	100	100	100			100	100	100	
1	103,6		100,4	88,6	94,3	94,9			47,1	111,0	106,5	
3	97,5		92,6	104,2	93,0	93,9			91,5	103,0	101,3	
6	99,5		92,7	101,3	99,7	98,2			68,6	107,3	96,4	
9	100,3		81,3	92,9	89,2	87,6			92,1	108,0	95,3	
12	94,3		100,5	95,3	104,4	98,5			79,2	104,0	95,1	
18	94,3		-	92,7					-	99,3	99,8	
24	99,0		90,7	100,7					97,2	104,2	100,2	
Actividad de trombina (% del valor cero), temperatura de almacenamiento: 20-25°C												
Período de tiempo de almacenamiento (meses)	tanda											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	105,6	92,4	90,9	91,8	92,6	94,3	95,5	101,7	99,8	107,3	99,4	81,1
3	92,3	88,2	86,9	88,4	80,0	77,9	75,8	95,4	96,3	84,2	98,9	77,0
6	85,6	66,3	66,8	80,4	71,4	68,6	75,3	92,8	89,0	69,4	84,8	60,6
9	72,1	58,3	58,8	75,9	51,8	50,7	59,1	96,1	91,9	48,8	74,4	53,3
12	64,2	50,1	51,5	65,3	43,7	43,9	42,8	100,9	90,6	42,9	64,7	46,6
18								-	-			
24								90,1	82,4			

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la producción de un preparado de trombina, en donde se purifica una protrombina obtenida a partir de un plasma o de una fracción de plasma, después de su activación para dar trombina, sin la adición de una tromboplastina, mediante una cromatografía por interacción hidrófoba.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** antes o después de la cromatografía por interacción hidrófoba se lleva a cabo adicionalmente todavía una cromatografía por intercambio de cationes.
- 15 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** después de la cromatografía por interacción hidrófoba y de la cromatografía por intercambio de cationes se lleva a cabo una filtración en una membrana con un pequeño tamaño de poros.
- 20 4. El procedimiento para la producción de un preparado de trombina de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 3, **caracterizado por que** la protrombina, que se emplea para la activación para dar trombina, se somete dentro del marco de su producción a una desactivación de virus o a un empobrecimiento en cuanto a virus.
- 25 5. El procedimiento para la producción de un preparado de trombina de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 4, **caracterizado por que**, antes o después de la purificación por cromatografía, la trombina se somete todavía a una adicional desactivación de virus o un adicional empobrecimiento en cuanto a virus.
- 30 6. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 5, **caracterizado por que** el preparado de trombina se ajusta a un valor del pH de 5,0 hasta 8,0.
- 35 7. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 6, **caracterizado por que** al preparado de trombina, junto a una sal soluble de calcio y cloruro de sodio, se le añaden como agentes estabilizadores
- una sustancia tamponadora,
 - un azúcar o un azúcar-alcohol y/o un aminoácido y/o
 - una sal de un ácido mono- o policarboxílico o
 - una sal de un ácido mono- o polihidroxicarboxílico.
- 40 8. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 7, **caracterizado por que** como agente estabilizador se añade un inhibidor de proteasas con una afinidad baja o mediana.
- 45 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado por que** como inhibidor de proteasas se añade benzamidina o p-amino-benzamidina.
- 50 10. Un preparado de trombina que es estable en el estado líquido, **caracterizado por que**, como sustancia inhibidora de la actividad de trombina, ella contiene benzamidina o p-amino-benzamidina, y porque, junto a una sal soluble de calcio y cloruro de sodio, ella contiene como agentes estabilizadores
- una sustancia tamponadora,
 - un azúcar o un azúcar-alcohol y/o un aminoácido y/o
 - una sal de un ácido mono- o policarboxílico o
 - una sal de un ácido mono- o polihidroxicarboxílico.
- 55 11. Un preparado de trombina de acuerdo con la reivindicación 10 para la utilización como agente hemostático, como componente de un agente hemostático o como componente de un pegamento tisular.