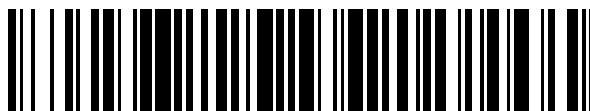


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 982**

51 Int. Cl.:

G01N 33/49 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

C12N 9/74 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2016** **PCT/IL2016/000004**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016** **WO16135719**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2016** **E 16717475 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020** **EP 3262409**

54 Título: **Método para purificar y cuantificar la trombina y sus polipéptidos de degradación**

30 Prioridad:

25.02.2015 IL 23741615

25.02.2015 US 201562120510 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.11.2020

73 Titular/es:

OMRIX BIOPHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)
Bldg.14 Weizmann Science Park, P.O. Box 619
Rehovot 7610601, IL

72 Inventor/es:

AUERBACH-NEVO, TAMAR;
ORR, NADAV y
NUR, ISRAEL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 791 982 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

Método para purificar y cuantificar la trombina y sus polipéptidos de degradación

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

Se proporciona un método que permite analizar y cuantificar α -trombina, α -trombina homogéneamente glicosilada y/o polipéptidos de degradación de trombina en soluciones proteínicas líquidas. En particular, se proporciona un método analítico y cuantitativo que emplea un solo paso cromatográfico. Además, se proporciona un método que permite la purificación eficiente y robusta de α -trombina y/o trombina glicosilada homogéneamente sin polipéptidos de degradación de trombina. La invención también puede usarse para la purificación y/o cuantificación de β -trombina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La trombina es una serín proteasa que se usa ampliamente en aplicaciones clínicas en varios productos comerciales. Es un componente común de los apósitos quirúrgicos, y se ha utilizado en combinación con fibrinógeno y otras proteínas en sistemas hemostáticos, como pegamentos de fibrina, adhesivos y selladores. Los selladores de fibrina comprenden típicamente un componente de fibrinógeno y un componente de trombina. Cuando ambos componentes se mezclan (p. ej., cuando se aplica a una herida sangrante o una incisión quirúrgica) la trombina separa los péptidos de fibrinógeno del fibrinógeno, lo que permite que este último genere polímeros/selladores de fibrina insolubles.

La trombina concentrada (por ejemplo, más de 500 UI/ml), purificada en forma líquida acuosa puede mostrar una reducción de la actividad durante el almacenamiento prolongado, principalmente como resultado de la autólisis. La evaluación de la degradación de la trombina es, por lo tanto, una herramienta analítica fisicoquímica esencial para determinar la estabilidad de la trombina.

La α -trombina de mamífero está compuesta por dos cadenas de polipéptidos unidos por disulfuro A y B. La cadena B está modificada postraduccionalmente (por ejemplo, por glicosilación) y exhibe actividad proteolítica de trombina hacia fibrinógeno y otras proteínas. La trombina puede autolizarse en derivados de polipéptido de β -trombina y trombina γ , que pueden identificarse parcialmente por electroforesis en gel y transferencia Western.

La autólisis de trombina es un desafío importante en la fabricación y almacenamiento de trombina, especialmente a altas concentraciones. Los métodos conocidos en la técnica para identificar polipéptidos de degradación de trombina (derivados de β -trombina y γ -trombina) son inadecuados porque proporcionan una separación insuficiente entre la trombina y sus polipéptidos de degradación, una separación desnaturizante y/o requieren mucho trabajo. Por lo tanto, la cuantificación no es precisa y/o posible.

Los antecedentes incluyen:

Wendeler M et al. "Process-scale purification and analytical characterization of highly gamma-carboxylated recombinant human prothrombin". Journal Chromatography A, 1325 (2014), 171-178; Braun, PJ et al. "Preparation and Characterization of Proteolyzed Forms of α -Thrombin". Thrombosis Research, 50 (2), 273-283; Boissel JP y col. "Covalent structures of beta and gamma autolytic derivatives of human alpha-thrombin". J Biol Chem. 10 de mayo de 1984; 259 (9): 5691-5697; Chang JY. "The structures and proteolytic specificities of autolysed human thrombin". Biochem J. 15 de diciembre 1986; 240 (3): 797-802; Karlsson G. "Analysis of human alpha-thrombin by hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography". Protein Expr Purif. Enero de 2003; 27 (1): 171-174; Patente Europea N° EP0443724 y EP0796623; y WO 2004/103519.

Boissel et. al.. describe el uso de CEX-HPLC seguido de análisis RP-HPLC para separar los diferentes polipéptidos de degradación de trombina. Chang describe análisis HPLC de fracciones de trombina pura separadas por cromatografía SEC y analizadas adicionalmente usando RP-HPLC. Los métodos anteriores tienen el inconveniente de requerir al menos dos pasos de separación para la cuantificación y separación de la trombina de otras proteínas.

Karlsson describe la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) para separar los productos de degradación de trombina.

La patente europea número EP 0443724 describe un método para preparar una trombina segura para virus, sin embargo, el método es desnaturizante y no muestra separación entre los diferentes productos de degradación de trombina o entre las diferentes variantes postraduccionales de α -trombina.

El documento WO 2004/103519 describe métodos para la separación de moléculas cargadas tales como proteínas de acuerdo con sus puntos isoelectrónicos (pI's) e incluye los sistemas y composiciones amortiguadoras empleadas para aislar moléculas cargadas.

Sigue habiendo una necesidad insatisfecha de métodos analíticos para cuantificar α -trombina o β -trombina y para la purificación de α -trombina intacta activa o de β -trombina a partir de soluciones proteínicas que superan los defectos

anteriores de la técnica.

SUMARIO DE LA INVENCION

- 5 Se proporciona un método cromatográfico de un solo paso para cuantificar α -trombina y/o α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente en una solución, la solución comprende la α -trombina y al menos uno de un polipéptido de degradación de α -trombina β -trombina y/o polipéptido de γ -trombina), especies de trombina modificadas postraduccionalmente u otra proteína.
- 10 Además, se proporcionan métodos para purificar α -trombina de soluciones proteínicas proporcionando una buena separación de, por ejemplo, trombina activa, funcional, no degradada intacta y/o α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente, las soluciones que comprenden la α -trombina y al menos uno de un polipéptido de degradación de α -trombina (polipéptido β -trombina y/o γ -trombina), especies de α -trombina modificadas postraduccionalmente u otra proteína.
- 15 Además, se proporcionan métodos para purificar una glicoforma de α -trombina homogénea a partir de una solución que comprende especies de α -trombina glicosiladas heterogéneas.
- 20 Además, se proporcionan métodos para purificar y/o cuantificar β -trombina en una solución que comprende la β -trombina y al menos una de α -trombina, por ejemplo, especies de α -trombina modificadas postraduccionalmente, γ -trombina u otra proteína.
- 25 Como se usa en el presente documento, el término "al menos uno de" es conjuntivo y disyuntivo en operación. Por ejemplo, las expresiones "al menos uno de A, B o C" significa: A solo, B solo, C solo, A y B juntos, A y C juntos, B y C juntos, o A, B y C juntos.
- La α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente puede ser α -trombina glicosilada homogéneamente o α -trombina sialilada homogéneamente y glicosilada homogéneamente.
- 30 Una glicoforma de α -trombina homogénea de acuerdo con la aplicación instantánea puede ser " α -trombina homogéneamente glicosilada" o "una especie de α -trombina homogéneamente glicosilada y homogéneamente sialilada".
- 35 Típicamente, una glicoforma es una isoforma de una proteína que difiere solo con respecto al número y/o tipo de glicanos o polisacáridos unidos. Las glicoproteínas a menudo consisten en varios glicanos diferentes, con alteraciones en los sacáridos unidos.
- 40 A menudo, los términos "glicano" y "polisacárido" se refieren a la porción de carbohidrato de un glucoconjugado, tal como una glicoproteína. Los glicanos pueden ser homo- o heteropolímeros de residuos de monosacáridos, y pueden ser lineales o ramificados. Los glicanos pueden transportar sacáridos con o sin cargas negativas.
- 45 Los métodos comprenden: poner en contacto la solución con un intercambiador de aniones. Los métodos permiten obtener un rendimiento robusto y reproducible, proporcionando α -trombina altamente purificada y activa y/o α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente; y cuantificación precisa de α -trombina, trombina homogénea modificada postraduccionalmente y/o sus polipéptidos de degradación. El método también permite la cuantificación y/o purificación de β -trombina independiente.
- 50 En un aspecto, se proporciona un método para purificar α -trombina de una solución que comprende la α -trombina y al menos uno de un polipéptido de degradación de α -trombina u otra proteína, el método comprende los pasos de: 1- poner en contacto la solución con un intercambiador de aniones; 2-separar la α -trombina del al menos uno de los polipéptidos de degradación de α -trombina (por ejemplo, a partir del polipéptido β -trombina y/o polipéptido γ -trombina) y/o la otra proteína mediante una cromatografía de intercambio aniónico (AEX) usando condiciones de elución diferencial; y 3-recolectar una fracción de α -trombina, obteniendo así α -trombina purificada; en donde las condiciones de elución diferenciales comprenden un gradiente de pH.
- 55 En algunas realizaciones, el método comprende separar la α -trombina de al menos uno del polipéptido de degradación de α -trombina (por ejemplo, polipéptido de β -trombina y/o γ -trombina) y la otra proteína mediante una cromatografía de intercambio aniónico (AEX) utilizando condiciones de elución diferencial; en donde las condiciones de elución diferenciales comprenden un gradiente de pH.
- 60 En una realización, la α -trombina es de una fuente de sangre o plasma humano. En otra realización, la α -trombina es de una fuente recombinante.
- 65 El término "separación" usado en el presente documento se refiere típicamente a aislar un compuesto específico de una solución que comprende el compuesto específico y otros compuestos.

En un aspecto, se proporciona un método para purificar homogéneamente α -trombina glicosilada de una solución que comprende α -trombina glicosilada heterogéneamente, comprendiendo el método los pasos de: 1-poner en contacto la solución con un intercambiador aniónico; 2-separar la α -trombina glicosilada homogéneamente de la α -trombina glicosilada heterogéneamente mediante una cromatografía de intercambio aniónico (AEX) usando condiciones de elución diferencial como se describe en las reivindicaciones; y 3-recoger una fracción de α -trombina homogéneamente glicosilada, obteniendo así trombina glicosilada homogéneamente purificada. En un aspecto, se proporciona un método para purificar α -trombina homogéneamente glicosilada de una solución que comprende trombina glicosilada heterogéneamente y al menos uno de un polipéptido de degradación de α -trombina u otra proteína. En otro aspecto, se proporciona un método para purificar α -trombina glicosilada homogéneamente a partir de una solución que comprende al menos uno de α -trombina glicosilada heterogéneamente, un polipéptido de degradación de α -trombina u otra proteína. El método comprende los pasos de: 1-poner en contacto la solución con un intercambiador de aniones; 2-separar la α -trombina glicosilada homogéneamente mediante una cromatografía de intercambio aniónico (AEX) usando condiciones de elución diferencial como se describe en las reivindicaciones; y 3-recoger una fracción de α -trombina homogéneamente glicosilada, obteniendo así α -trombina purificada homogéneamente glicosilada. En algunas realizaciones después del paso 1, el paso de contacto, un paso de lavado, se lleva a cabo usando una solución/tampón isocrático.

En una realización de la invención, el método comprende los pasos de: cargar la solución que contiene trombina en un intercambiador de aniones; lavado con una solución isocrática; desechar la fracción lavada; y eluir una fracción de α -trombina deseada usando una solución no isocrática tal como un gradiente de pH. El uso de una solución isocrática se relaciona típicamente con el uso de una fase móvil de composición constante en cromatografía líquida.

"Una fracción de α -trombina deseada" se refiere típicamente a cualquier α -trombina presente en una solución para la cual está destinada la purificación y/o cuantificación, incluyendo, por ejemplo, α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente, por ejemplo, α -trombina glicosilada homogéneamente o α -trombina homogéneamente glicosilada y homogéneamente sialilada.

En un aspecto, se proporciona un método para purificar una glicoforma de α -trombina homogénea a partir de una solución que comprende especies de α -trombina glicosiladas heterogéneas, comprendiendo el método los pasos de:

poner en contacto la solución con un intercambiador de aniones;
separar la glicoforma de α -trombina homogénea de la especie heterogénea por cromatografía de intercambio aniónico usando condiciones de elución diferenciales, y
recoger una fracción homogénea de glicoforma de α -trombina,
obteniendo así glicoforma de α -trombina homogénea purificada.

En una realización, el método también comprende la etapa de cuantificar la glicoforma de α -trombina homogénea purificada.

En otro aspecto, se proporciona un método cromatográfico de un paso o de un solo paso para cuantificar α -trombina en una solución que comprende la α -trombina y al menos uno de un polipéptido de degradación de α -trombina u otra proteína, comprendiendo el método los pasos de: separar la α -trombina del al menos uno de los polipéptidos de degradación de α -trombina u otra proteína en la cromatografía de intercambio aniónico mediante condiciones de elución diferencial; recolectar una fracción de α -trombina; y cuantificar la trombina. En otro aspecto, se proporciona un método cromatográfico de un paso o de un solo paso para cuantificar α -trombina en una solución que comprende la α -trombina y al menos uno de un polipéptido de degradación de α -trombina u otra proteína, comprendiendo el método los pasos de: contactar la solución con un intercambiador de aniones; separar la trombina del al menos uno de los polipéptidos de degradación de la α -trombina u otra proteína en la cromatografía de intercambio aniónico mediante condiciones de elución diferencial, siendo las condiciones de elución diferencial un gradiente de pH; recolectar una fracción de α -trombina; y cuantificar la α -trombina.

En algunas realizaciones, la α -trombina es de un mamífero, por ejemplo, una fuente de plasma humano o de cerdo o una proteína recombinante.

Los métodos cromatográficos descritos en este documento pueden llevarse a cabo utilizando todas las técnicas conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, un dispositivo de cromatografía de líquido de alto rendimiento; se puede emplear una cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC) y/o una columna independiente con o sin un detector conectado.

En una realización, se usa un método de cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC; también denominada cromatografía líquida de alta presión), es típicamente una técnica que se basa en bombas para hacer pasar un solvente líquido presurizado que contiene la mezcla de muestra a través de una columna llena de un material adsorbente sólido. Cada componente de la muestra interactúa de manera ligeramente diferente con el material adsorbente, lo que lleva a la separación de los componentes.

La HPLC se distingue de la cromatografía líquida tradicional ("baja presión") porque las presiones operativas son significativamente más altas (50-350 bar). Algunos modelos de bombas mecánicas en un instrumento HPLC pueden mezclar varios solventes en proporciones que cambian en el tiempo, generando un gradiente de composición en la fase móvil. Varios detectores son de uso común, como ultravioleta (UV), matriz de fotodiodo (PDA) o espectrometría de masas. La detección puede llevarse a cabo utilizando un detector de absorbancia UV a 190-400 nm ($A_{190\text{ nm}} - A_{400\text{ nm}}$). En una realización, cuando se incluyen aminos en el tampón de elución, la absorbancia se mide a aproximadamente $A_{280\text{ nm}}$.

Típicamente, una separación cromatográfica, por ejemplo, una ejecución de HPLC, consiste en al menos los siguientes pasos: se pone en contacto una columna equilibrada, por ejemplo, cargada con una muestra/mezcla ("Carga"). Después de cargar, se puede llevar a cabo un paso de lavado. Después de este paso, los componentes separados se eluyen de la columna. Esto puede llevarse a cabo isocráticamente (sin cambiar la composición del tampón en comparación con los pasos de carga y/o equilibrio) o mediante un gradiente (cambiando al menos una de las características del tampón, por ejemplo, concentración de sal, polaridad, pH). En una realización, la elución se lleva a cabo usando un gradiente lineal. En el siguiente paso, la columna se puede regenerar ("Regeneración de columna"), lo que significa que los componentes restantes reciben tiempo adicional a la concentración más alta de la característica modificada (concentración de sal, polaridad, pH) para eluir de la columna material restante. La regeneración puede llevarse a cabo alternativamente cambiando otras características del tampón (no cambiadas durante el paso de elución). El último paso ("Equilibrio de columna") puede ser un paso de equilibrio, para permitir que la columna regrese al estado original en donde la columna es adecuada para un uso adicional. Los pasos descritos se pueden llevar a cabo alternativamente utilizando un dispositivo FPLC y/o una columna independiente. La separación cromatográfica es bien conocida en la técnica como se describe en Hidayat Ullah Khan (2012). The Role of Ion Exchange Chromatography in Purification and Characterization of Molecules, Ion Exchange Technologies, capítulo 14,331-334.

Ventajosamente, los métodos según la invención proporcionan una buena separación máxima de la α -trombina intacta de sus polipéptidos de degradación y/o de otras proteínas en la solución de trombina. Típicamente, en los métodos cromatográficos "buena separación"/"buena separación de pico" se considera una separación eficiente de los componentes, en donde los picos detectados, como representativos de la elución de los componentes, no se superponen; es decir, la respuesta del detector vuelve al nivel de línea base entre los picos. El término "buena separación de pico" también pretende incluir "separación suficiente" en donde aparece una clara distinción entre los picos de elución, sin embargo, la respuesta del detector no regresa completamente al nivel de línea base entre los picos.

La eficacia de separación/resolución se puede evaluar visualmente. Alternativamente o además, la resolución (R_s), el grado en que una columna cromatográfica separa componentes entre sí, puede definirse matemáticamente: la resolución es la diferencia entre los tiempos de retención de pico de un pico seleccionado y el pico que lo precede multiplicado por un constante de 1,18, luego dividida por la suma de los anchos de pico a 50% de la altura máxima. El término "tiempo de retención" se refiere al intervalo entre el instante de inyección y la detección del ápice máximo (el punto más alto del pico) como representante de elución.

Generalmente, un nivel de resolución igual o superior a 2 se considera una buena separación del componente y permite una buena cuantificación del pico. Una resolución igual o superior a 1,5 (y menor que 2) se considera como "separación suficiente" que permite la separación y/o cuantificación.

En una realización de los métodos, la resolución entre los picos de α -trombina y sus polipéptidos de degradación está en el intervalo de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 8.

En una realización de los métodos, la resolución entre los picos de α -trombina y otras proteínas en la solución de trombina es superior a 8.

En una realización de los métodos, la resolución entre los diferentes picos de especies de trombina está en el rango de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 8.

En una realización, la resolución entre los diferentes polipéptidos de degradación de α -trombina (β -trombina y γ -trombina) son inferiores a 1,5, tal como igual a 0. En una realización, β -trombina e γ -trombina eluyen en el mismo pico. En otra realización, una determinada forma de β -trombina eluye en un pico separado, por ejemplo, la resolución entre β -trombina y otros componentes en la solución es de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 8. Por consiguiente, en un aspecto, la invención también proporciona un método para purificar β -trombina de una solución que comprende la β -trombina y al menos una de α -trombina, γ -trombina u otra proteína, comprendiendo el método los pasos de: poner en contacto la solución con un intercambiador aniónico; separando la β -trombina de al menos una de la α -trombina, γ -trombina y/u otra proteína por cromatografía de intercambio aniónico usando condiciones de elución diferencial, como se ha descrito en las reivindicaciones; y recoger una fracción de β -trombina, obteniendo así la β -trombina purificada.

El término "fracción de β -trombina" se refiere típicamente a la fracción recogida después de la elución del intercambiador de aniones cargado (por ejemplo, columna cargada) con un tampón en condiciones de elución

diferencial.

En otro aspecto, la invención proporciona un método cromatográfico de un paso para cuantificar la β -trombina en una solución que comprende la β -trombina y al menos α -trombina, γ -trombina u otra proteína, comprendiendo el método los pasos de: poner en contacto la solución con un intercambiador de aniones; separar la β -trombina de la al menos una de α -trombina, γ -trombina y/o la otra proteína en la cromatografía de intercambio aniónico mediante las condiciones de elución diferencial; y cuantificando la β -trombina.

En algunas realizaciones, el método incluye además identificar las fracciones que contienen β -trombina, α -trombina y/o γ -trombina separadas. En algunas realizaciones, el método incluye además la cuantificación de la α -trombina y/o γ -trombina.

En algunas realizaciones, el método comprende separar la β -trombina de al menos una de la α -trombina, γ -trombina y otra proteína por cromatografía de intercambio aniónico usando condiciones de elución diferencial.

En algunas realizaciones, el método cromatográfico es un método de cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico. En algunas realizaciones, las condiciones de elución diferencial comprenden un gradiente de pH, por ejemplo, generado usando un eluyente que comprende una amina o una mezcla de aminas. En algunas realizaciones, el intercambiador aniónico está hecho de partículas no porosas.

En otro aspecto, la invención proporciona una β -trombina purificada obtenible por los métodos de la invención; una β -trombina aislada; y una formulación/kit que comprende la β -trombina purificada/aislada como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, el método permite separar y recoger fracciones homogéneas de α -trombina modificadas postraduccionalmente. En algunas realizaciones, la modificación postraducciona homogénea es la glicosilación homogénea. En algunas realizaciones, la modificación postraducciona homogénea es la glicosilación y la sialilación homogéneas. En algunas realizaciones, la fracción de α -trombina separada/recogida es una α -trombina glicosilada homogénea. En algunas realizaciones, la α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente está representada por una sola glicoforma. En algunas realizaciones, la glicoforma de α -trombina separada/recogida se glucosila homogéneamente y/o se sialila homogéneamente. En algunas realizaciones, la homogeneidad de la trombina modificada postraduccionalmente aislada, separada y/o recogida, por ejemplo, la glicoforma de α -trombina homogénea es un nivel de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o al menos 100% de identidad. Por ejemplo, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 o menos del 100%, incluido cualquier rango entre los porcentajes revelados, como 50-55%, 50-60%, 50-65%, 50-70%, 50-75%, 50-80%, 50-85%, 50-90%, 50-95%, 50-99%, 50-100%, 55-60%, 55-65%, 55-70%, 55-75%, 55-80%, 55-85%, 55-90%, 55-95%, 55-100%, 60-65%, 60-70%, 60-75%, 60-80%, 60-85%, 60-90%, 60-95%, 60-99%, 60-100%, 65-70%, 65-75%, 65-80%, 65-85%, 65-90%, 65-95%, 65-99%, 65-100%, 70-75%, 70-80%, 70-85%, 70-90%, 70-95%, 70-99%, 70-100%, 75-80%, 75-85%, 75-90%, 75-95%, 75-99%, 75-100%, 80-85%, 80-90%, 80-95%, 80-99%, 80-100%, 85-90%, 85-95%, 85-99%, 85-100%, 90-95%, 90-99%, 90-100%, 95-99%, 95-100% identidad. En otra realización más, la α -trombina no está modificada, por ejemplo, no glicosilada.

En algunas realizaciones, la solución proteínica incluye al menos una de otra proteína, un polipéptido de degradación de α -trombina (por ejemplo, polipéptido de β -trombina y/o polipéptido de γ -trombina), una α -trombina que no se modifica postraduccionalmente (una α -trombina no modificada) o una α -trombina modificada postraduccionalmente.

En algunas realizaciones, la solución incluye una mezcla de α -trombina no modificada y modificada postraduccionalmente.

En algunas realizaciones, la solución incluye α -trombina heterogénea modificada postraduccionalmente que incluye diferentes especies de glicoforma de α -trombina.

En algunas realizaciones, la solución incluye otra proteína o un fragmento de proteína, que puede ser, por ejemplo, una proteína que se agregó a la solución. En algunas realizaciones, la proteína es, por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA). En algunas realizaciones del método, la solución incluye al menos uno de los polipéptidos de degradación de α -trombina u otra proteína.

En algunas realizaciones del método, la solución incluye al menos uno de polipéptido de degradación de trombina o HSA.

En algunas realizaciones del método, la solución incluye al menos uno de polipéptido de degradación de trombina y HSA.

En algunas realizaciones, el método comprende la etapa de: cargar la solución en una columna de intercambio aniónico. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la solución con un intercambiador de

aniones en forma por lotes.

Como se usa en este documento, "método por lotes", "por lotes" y "forma por lotes" generalmente se refieren a una técnica en donde se pone en contacto una solución con una resina, típicamente en un procedimiento de adsorción de una sola etapa. "Un procedimiento de adsorción de una sola etapa" se refiere a un procedimiento en donde todos los componentes del proceso de purificación (por ejemplo, la resina y la solución) se incuban juntos, por ejemplo, en un tanque agitado, un reactor discontinuo o un recipiente, y la adsorción se lleva a cabo de una manera continua. La fracción unida a la resina se puede recoger mediante una etapa adicional de centrifugación y/o filtración.

En algunas realizaciones, antes de contactar, por ejemplo, cargar el intercambiador/columna se equilibra a un pH de 10,5 a aproximadamente pH 7,0 (por ejemplo, un pH de 9,1). El equilibrio puede llevarse a cabo utilizando un tampón o tampones adecuados para equilibrar el intercambiador a un pH de 10,5 a aproximadamente pH 7,0 (por ejemplo, un pH de 9,1).

En una realización, el tampón comprende una mezcla de aminas. En algunas realizaciones, la mezcla de aminas utilizada para el equilibrio incluye piperazina, trietanolamina, bis-tris propano, 1-metilpiperazina, bicina, bis-tris, dietanolamina, dietilamina, 1-histidina, imidazol, piridina, tricina, trietanolamina y/o tris.

En algunas realizaciones, la mezcla de aminas usada para el equilibrio consiste en piperazina, trietanolamina, bis-tris propano y 1-metilpiperazina. En algunas realizaciones, la concentración de las aminas en el tampón de equilibrio está en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mM, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mM o aproximadamente 20 mM.

La velocidad de flujo durante el contacto, por ejemplo, la carga puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,4 ml/minuto. En algunas realizaciones, las condiciones para permitir la separación entre los polipéptidos de degradación de α -trombina, α -trombina, glicofoma de α -trombina homogénea y/u otra proteína incluyen la aplicación de condiciones de elución diferencial tales como someter el intercambiador de aniones/columna a condiciones de gradiente de pH para elución.

En algunas realizaciones, las condiciones de elución diferencial comprenden aplicar un gradiente, por ejemplo, gradual o continuo (por ejemplo, lineal). Típicamente, un "gradiente continuo" se define como un gradiente en donde la composición eluyente se cambia gradualmente, continuamente y constantemente mientras que el "gradiente gradual" incluye cambios instantáneos en la composición eluyente.

En algunas realizaciones, la longitud del gradiente está en el intervalo de 5 minutos a 100 minutos o de 5 minutos a 60 minutos. En otra realización, la longitud del gradiente es superior a 25 minutos, por ejemplo superior a 30 o superior a 35 minutos. En algunas realizaciones, la longitud del gradiente está en el rango de más de 25 minutos a 35 minutos o en el rango de más de 25 minutos a 30 minutos.

En una realización, la elución se lleva a cabo con el mismo tampón usado para el equilibrio del intercambiador aniónico.

En algunas realizaciones, el gradiente de pH lineal es de aproximadamente pH 10,5 a aproximadamente pH tal como en el intervalo de aproximadamente 9,1 a aproximadamente pH 3,4.

En algunas realizaciones, el gradiente de pH se genera usando un eluyente que comprende amina o una mezcla de aminas. En algunas realizaciones, el gradiente de pH lineal se genera usando un tampón eluyente que comprende una mezcla de aminas. En algunas realizaciones, la mezcla de aminas usada durante las condiciones de elución diferencial incluye piperazina, trietanolamina, bis-tris propano, 1-metilpiperazina, bicina, bis-tris, dietanolamina, dietilamina, 1-histidina, imidazol, piridina, tricina, trietanolamina y/o tris. En algunas realizaciones, la mezcla de aminas usada durante las condiciones de elución diferencial consiste en piperazina, trietanolamina, bis-tris propano y 1-metilpiperazina. En algunas realizaciones, la concentración de cada amina en el tampón está en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mM. En algunas realizaciones, la concentración de cada amina en el tampón es de aproximadamente 20 mM.

En algunas realizaciones, el gradiente de pH lineal se genera usando dos tampones eluyentes que comprenden una mezcla de aminas. En algunas realizaciones, el gradiente de pH lineal se genera usando dos tampones eluyentes que comprenden la misma mezcla de aminas. Típicamente, el pH del tampón de elución depende de la relación entre el tampón A y B durante la elución. En algunas realizaciones, el tampón A tiene un pH de aproximadamente 9,1 y el tampón B tiene un pH de aproximadamente 3,4, y la concentración de tampón A disminuye de aproximadamente 40% a aproximadamente 60% y el tampón B aumenta de aproximadamente 60% a aproximadamente 40%. En algunas realizaciones, el tampón A tiene un pH de aproximadamente 9,1 y el tampón B tiene un pH de aproximadamente 3,4, y la concentración de tampón A disminuye de aproximadamente 100% a aproximadamente 0% y el tampón B aumenta de aproximadamente 0% a aproximadamente 100%. En algunas realizaciones, el tampón A tiene un pH de aproximadamente 9,1 y el tampón B tiene un pH de aproximadamente 3,4, y la concentración de tampón disminuye de aproximadamente 90% a aproximadamente 0% y el tampón B aumenta de aproximadamente 10% a aproximadamente 100%. En algunas realizaciones, el incremento del % de tampón B por minuto está en el rango de

aproximadamente 0,1% a aproximadamente 10% o en el rango de aproximadamente 3,5% a aproximadamente 4,5%. En algunas realizaciones, el incremento del % de tampón B por minuto se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 3,5%, 3,75%, 4%, 4,25% o 4,5%. En algunas realizaciones, el incremento del % de tampón B por minuto es aproximadamente del 3,5%.

5 En algunas realizaciones, las condiciones de elución comprenden una velocidad de flujo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,4 ml/minuto, o de aproximadamente 0,25 a 1,0 ml/minuto, o de 0,5 ml/minuto a 0,8 ml/minuto, o de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,0 ml/minuto. En algunas realizaciones, las condiciones de elución comprenden una velocidad de flujo de aproximadamente 1 ml/minuto.

10 En algunas realizaciones, las condiciones de elución comprenden los siguientes pasos: de 90% al 100% de tampón B a un aumento/pendiente lineal de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 10%, aproximadamente 10%, o aproximadamente 3,5% a aproximadamente 4,5% de tampón B por minuto.

15 En algunas realizaciones, las condiciones de elución comprenden los siguientes pasos: de 100% de tampón B a un aumento/pendiente lineal de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 10%, aproximadamente 10%, o aproximadamente 3,5% a aproximadamente 4,5% de tampón B por minuto.

20 En algunas realizaciones, las condiciones de elución comprenden los siguientes pasos: de 100% de tampón B a un aumento/pendiente lineal de aproximadamente 3,5% de tampón B por minuto.

En algunas realizaciones, las condiciones de elución comprenden los siguientes pasos: de 100% de tampón B a un aumento/pendiente lineal de aproximadamente 3,5% de tampón B por minuto.

25 En algunas realizaciones de los métodos, el intercambiador de aniones es un intercambiador de aniones débil o fuerte. En algunas realizaciones del método, el intercambiador aniónico consiste en grupos con carga positiva de amonio cuaternario. En algunas realizaciones del método, el intercambiador aniónico se basa en aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 μm , por ejemplo 5 μm de perlas de polímero. En algunas realizaciones del método, las perlas de polímero consisten en poli(estireno/divinilo/benceno). En algunas realizaciones del método, el intercambiador de aniones consiste en partículas no porosas o porosas, por ejemplo, los poros de las partículas están en el intervalo de aproximadamente 120 a 1000 Angstrom (Å). En algunas realizaciones del método, el intercambiador aniónico consiste en partículas no porosas. En algunas realizaciones del método, el intercambiador aniónico consiste en partículas monodispersas.

35 En algunas realizaciones del método, se usa una columna de intercambio aniónico que tiene al menos una de las siguientes características: un ancho en el intervalo de 1,7 a 10 mm (p. ej. 4,6 mm), y una longitud en el rango de 10 a 250 mm (por ejemplo, 250 mm).

40 En algunas realizaciones del método, una columna de intercambio aniónico que tiene un ancho en el rango de 1,7 a 10 mm (por ejemplo, 4,6 mm) y una longitud en el rango de 10 a 250 mm (p. ej. 250 mm) se utiliza.

En algunas realizaciones de los métodos, el método consiste en un método cromatográfico de una etapa, por ejemplo, un tipo de método cromatográfico sin etapas cromatográficas y/o de separación adicionales.

45 En algunas realizaciones, el método de purificación se lleva a cabo mediante un intercambio aniónico Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento, una Cromatografía Líquida de Proteína Rápida (FPLC) y/o mediante una columna independiente con o sin un detector conectado.

50 En algunas realizaciones, el método es para fines analíticos. También se describe aquí una α -trombina purificada obtenible por los métodos proporcionados en el presente documento.

También se describe en el presente documento una α -trombina homogénea aislada modificada postraduccionalmente. En algunas realizaciones, la α -trombina es de una fuente de plasma de mamífero, por ejemplo, de una fuente de plasma humano o de cerdo. En otro aspecto, se describe en el presente documento una α -trombina homogénea aislada modificada postraduccionalmente a partir de sangre de mamífero o fuente de plasma.

55 En algunas realizaciones, la modificación postraduccional es la glicosilación. En algunas realizaciones, la modificación postraduccional es la glicosilación y sialilación. En algunas realizaciones, la α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente está representada por una glicofoma única/particular. En algunas realizaciones, la glicofoma de trombina se sialila adicionalmente. En algunas realizaciones, la glicofoma de α -trombina se sialila homogéneamente. En algunas realizaciones, la α -trombina homogénea aislada modificada postraduccionalmente es α -trombina glicosilada homogéneamente. En algunas realizaciones, la trombina aislada homogénea modificada postraduccionalmente está representada por una glicofoma particular. En algunas realizaciones, la α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente aislada es trombina sialilada homogéneamente.

65 También se describe aquí una formulación que comprende una α -trombina purificada o una α -trombina homogénea

aislada modificada postraduccionalmente descrita aquí. En algunas realizaciones, la α -trombina purificada o una α -trombina homogénea aislada modificada postraduccionalmente se obtiene mediante los métodos descritos en este documento. En algunas realizaciones de la formulación, la α -trombina es de fuente de plasma de mamífero. En algunas realizaciones, la α -trombina es de origen sanguíneo o plasmático. En algunas realizaciones, la formulación comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La formulación descrita en el presente documento puede congelarse o liofilizarse.

En otro aspecto, se proporciona aquí un método para proporcionar un tratamiento hemostático, sellado, fijación de injerto, cicatrización de heridas y/o anastomosis, a una superficie en un sujeto, que comprende aplicar a la superficie una formulación que comprende la α -trombina purificada, la α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente o la β -trombina. La formulación se puede aplicar con una solución que comprende fibrinógeno. La superficie puede ser un sitio sangrante o no sangrante. El sujeto puede ser un sujeto humano.

También se describe el uso de una formulación que comprende una α -trombina homogénea aislada modificada postraduccionalmente, una α -trombina purificada o β -trombina como se describe anteriormente para el tratamiento hemostático, sellado, fijación de injerto, cicatrización de heridas, antiadhesión y/o anastomosis.

También se describe aquí un kit que comprende un recipiente tal como una ampolla, un vial y/o una jeringa que incluye la α -trombina purificada, la α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente o la β -trombina como se describe anteriormente; y opcionalmente un dispositivo de aplicación y/o instrucciones de uso.

En otro aspecto, se describe un kit que comprende un recipiente que comprende una α -trombina homogénea aislada modificada postraduccionalmente o una glicofoma de α -trombina homogénea purificada como se describe anteriormente como primer componente.

En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente que comprende gelatina, por ejemplo, como un segundo componente. El kit puede incluir además fibrinógeno. En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente que comprende fibrinógeno, por ejemplo, como un segundo componente. El kit puede incluir al menos un contenedor y al menos una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, ampollas, viales, jeringas y tubos. Los contenedores pueden estar hechos, por ejemplo, de vidrio, metal o plástico.

Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención se harán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada de la invención y las figuras.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra una vista ampliada de un cromatograma representativo en la región de los picos de elución obtenidos usando una cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) de varias muestras: HSA, solución de trombina, trombina formulada y agua. Las muestras inyectadas fueron: a) 30 μ l de solución de trombina; b) 100 μ l de trombina formulada; c) 100 μ l 5 mg/ml de HSA; y d) 100 μ l de agua de grado HPLC como muestra en blanco.

En todas las Figs. las representaciones de muestra se muestran de arriba a abajo según el comienzo del cromatograma, la muestra inyectada (de arriba a abajo) aparece en el cromatograma. Las ejecuciones de las diferentes muestras se muestran en una figura como superposiciones apiladas. En todos los gráficos, el eje y está etiquetado como Unidad de Absorbancia (AU); y el eje x se etiqueta como minutos.

La Fig. 2 muestra una vista ampliada de un cromatograma representativo en la región de los picos de elución obtenidos usando Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento de Intercambio aniónico (AEX-HPLC) y elución con un gradiente de sal lineal NaCl a pH 8,0. Las muestras inyectadas fueron: a) 30 μ l de solución de trombina; b) 100 μ l de trombina formulada; c) 100 μ l 5 mg/ml de HSA; y d) 100 μ l de tampón A como muestra en blanco.

La Fig. 3 muestra un cromatograma representativo obtenido para diferentes muestras inyectadas en el AEX-HPLC y eluidas usando un gradiente de sal lineal de NaCl a pH 6,0. Las muestras inyectadas fueron: a) 30 μ l de solución de trombina; b) 100 μ l de trombina formulada; c) 100 μ l 5 mg/ml de HSA; y d) 100 μ l de Tampón A como muestra en blanco.

La Fig. 4 muestra una vista ampliada de un cromatograma representativo en la región de los picos de elución obtenidos usando AEX-HPLC con un gradiente de sal lineal de NaCl a pH 7,5. Las muestras inyectadas fueron: a) 30 μ l de solución de trombina; b) 100 μ l de trombina formulada c) 100 μ l 5 mg/ml de HSA; y d) 100 μ l de tampón A como muestra en blanco.

La Fig. 5 muestra un cromatograma representativo en la región de los picos de elución obtenidos usando AEX-HPLC con un gradiente de sal lineal de NaNO₃ a pH 8,0. Las muestras inyectadas fueron: a) 30 μ l de solución de trombina; b) 100 μ l de trombina formulada; y c) 100 μ l 5 mg/ml de HSA.

La Fig. 6 muestra un cromatograma representativo de las muestras inyectadas obtenidas usando AEX-HPLC con un gradiente de pH lineal entre pH 9,1 y pH 3,4. Las muestras inyectadas fueron: a) 30 μ l de solución de trombina; b) 100 μ l de trombina formulada; c) 100 μ l 5 mg/ml de HSA; y d) 100 μ l de tampón A como muestra en blanco. La elución se realizó con tampones a base de amina.

La Fig. 7 es una vista ampliada de la región de elución de trombina en el cromatograma que se muestra en la Fig. 6.

La Fig. 8 muestra una vista ampliada de los cromatogramas obtenidos usando AEX-HPLC y elución a un gradiente de pH lineal a diferentes velocidades de flujo: 0,25, 0,5, 0,75 y 1 ml/min. La muestra inyectada fue 30 μ l de solución de trombina para cada caudal probado.

La Fig. 9 muestra el efecto de la pendiente del gradiente lineal en la separación/resolución (evaluada mediante inspección visual). Se evaluaron diferentes incrementos de % tampón B por minuto: 4,5%, 4,25%, 4%, 3,75% y 3,5%. La muestra inyectada era 30 μ l de solución de trombina para cada incremento probado.

La Fig. 10 muestra cromatogramas superpuestos de α , β y γ patrones de trombina, solución de trombina y tampón A como una muestra en blanco obtenida usando AEX-HPLC a un caudal de 1,0 ml/min. Se identificaron diferentes picos de trombina para la solución de trombina en comparación con los estándares comerciales de trombina.

La Fig. 11 muestra diferentes picos de trombina separados de una solución de trombina usando un gradiente de pH lineal AEX-HPLC entre 100% de tampón A a 100% de tampón B en una pendiente de 3,5% de B por minuto. Los picos eluidos se recogieron y se identificaron adicionalmente usando transferencia Western como herramienta cualitativa.

La Fig. 12 muestra un cromatograma con diferentes especies de trombina resueltas por HPLCAEX. Se inyectó una solución de trombina sometida a eliminación de ácido siálico y una solución de trombina sin tratamiento. Los resultados muestran que la eliminación de ácido siálico afecta la carga de las especies de trombina presentes, lo que a su vez afecta el perfil de elución, lo que resulta en un desplazamiento general de los picos hacia el lado izquierdo del cromatograma (en comparación con una solución de trombina no tratada).

La Fig. 13 muestra un cromatograma de longitud completa de una muestra de trombina inyectada obtenida usando un gradiente de pH lineal AEX-HPLC, con un incremento de 3,5% de tampón B por minuto, y condiciones de flujo de 1,0 ml/min. Los resultados muestran una separación completa entre la albúmina sérica humana, varios picos de α -trombina correspondientes a diferentes especies de α -trombina modificadas de forma postraducciona homogénea y acetiltriptófano.

La Fig. 14 muestra una vista ampliada de las especies de α -trombina y la región de elución de los polipéptidos de degradación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El método proporcionado en el presente documento se basa, en parte, en el descubrimiento de que una α -trombina intacta puede aislarse/purificarse de una solución de proteína heterogénea, por ejemplo, con respecto a la modificación postraducciona (por ejemplo, nivel de glicosilación y/o sialilación), α -trombina intacta utilizando la cromatografía de intercambio aniónico (AEX). Además, el método de acuerdo con la invención se basa en el descubrimiento de que la α -trombina o la β -trombina pueden aislarse/purificarse de una solución que comprende otras proteínas, por ejemplo, un estabilizador tal como albúmina sérica humana y/o albúmina sérica bovina.

Se descubrió sorprendentemente que el método de acuerdo con la invención permite una purificación y/o cuantificación de alta resolución de α -trombina o β -trombina en presencia de altas cantidades de otras proteínas en relación con la concentración de trombina en la solución.

Más particularmente, el método de acuerdo con la invención permite purificar y/o cuantificar diferentes especies homogéneas de α -trombina modificadas postraduccionalmente (p. ej. glicoformas de α -trombina homogéneas) en alta resolución a partir de una solución heterogénea que comprende altas cantidades de otras proteínas, por ejemplo, estabilizadores tales como albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina y similares.

En algunas realizaciones, las otras proteínas, por ejemplo, albúmina sérica, están presentes en la solución a una concentración de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 50 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 5 a aproximadamente 6,5 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de trombina en la solución está en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 10000 UI/ml, por ejemplo, aproximadamente 800 a aproximadamente 1200 UI/ml o aproximadamente 0,3 mg/ml. En algunas realizaciones, la relación de trombina (UI) a otras proteínas (mg) está en el intervalo de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:40 o aproximadamente 1:14 a aproximadamente 1:27.

En particular, se proporciona en el presente documento un método cromatográfico de un solo paso para la purificación y/o cuantificación de la α -trombina de una solución que comprende trombina proporcionando una buena separación

máxima de la α -trombina modificada postraduccionallymente intacta de sus polipéptidos de degradación y otras proteínas en una formulación de trombina. Además, en este documento se proporcionan herramientas para la separación entre α -trombina, sus polipéptidos de degradación y otras proteínas (por ejemplo, HSA) en una solución/formulación de trombina.

" α -trombina intacta" se refiere, por ejemplo, a una forma no dañada, no degradada y/o funcional de α -trombina.

Hasta ahora, la trombina se purificó y analizó mediante cromatografía de fase inversa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de intercambio catiónico y/o SDS-PAGE y transferencia Western.

En este documento se proporciona un método para purificar α -trombina de una solución que comprende la trombina y al menos uno de un polipéptido de degradación de α -trombina (por ejemplo, polipéptidos de β -trombina y/o γ -trombina) u otra proteína, el método comprende los pasos de: contactar la solución con un intercambiador de aniones; separar la α -trombina de al menos uno de los polipéptidos de degradación de α -trombina u otra proteína mediante una cromatografía de intercambio aniónico usando condiciones de elución diferencial, por ejemplo, gradiente de pH; y recolectar una fracción de α -trombina, obteniendo así α -trombina purificada.

Además, en este documento se proporciona un método para purificar una especie de α -trombina homogénea modificada postraduccionallymente (por ejemplo, glicoforma de α -trombina homogénea) a partir de una solución que comprende especies de α -trombina modificadas postraduccionallymente heterogéneas (p. ej. especies heterogéneas de α -trombina glicosilada), y opcionalmente al menos uno de un polipéptido de degradación de trombina u otra proteína; el método comprende los pasos de: poner en contacto la solución con un intercambiador de aniones; separar las especies homogéneas de α -trombina modificada postraduccionallymente de las otras especies de α -trombina modificada postraduccionallymente; y opcionalmente el polipéptido de degradación de α -trombina y/o la otra proteína; por condiciones de elución diferencial, por ejemplo, gradiente de pH, y recolectar una fracción de α -trombina homogénea modificada postraduccionallymente, obteniendo de este modo especies de α -trombina homogénea modificada postraduccionallymente purificada.

Los términos "purificando", "purificar" y similares se refieren a eliminar, aislar o separar la α -trombina (por ejemplo, una trombina homogénea, modificada postraduccionallymente) o β -trombina de una solución que la comprende. La solución que contiene α -trombina también puede comprender un polipéptido de degradación de α -trombina (β -trombina y/o γ -trombina), otra proteína y/u otra especie de α -trombina modificada postraduccionallymente. La solución que contiene α -trombina también puede comprender α -trombina, γ -trombina, otra proteína y/o especies modificadas postraduccionallymente de α -trombina.

El término "contacto" se refiere a cualquier tipo de acción de combinación que lleva la solución a un contacto suficientemente cercano con el intercambiador aniónico que comprende los grupos cargados positivamente, de manera que se producirá una interacción de unión entre los grupos cargados positivamente y cualquier compañero de unión, por ejemplo, α -trombina o β -trombina, presente en la solución. La solución se puede incubar con el intercambiador de aniones durante un período de tiempo suficiente, por ejemplo, 1 minuto o más, lo que permite el contacto y/o la unión entre los grupos cargados positivamente y la α -trombina o β -trombina.

El término "fracción de α -trombina" se refiere típicamente a la fracción recogida después de la elución del intercambiador de aniones cargado (por ejemplo, columna cargada) con un tampón Bajo condiciones de elución diferenciales. En una realización, la fracción de α -trombina recogida consiste en solo α -trombina. En otra realización, la fracción de α -trombina recogida consiste en una especie de α -trombina homogénea. En otra realización, la fracción de α -trombina recogida consiste en una fracción de glicoforma de α -trombina homogénea.

El término " α -trombina purificada", típicamente, se refiere a una preparación de α -trombina obtenida después del aislamiento de la α -trombina a partir de polipéptidos de degradación de α -trombina y/u otra proteína presente en la solución que comprende la trombina de partida usando un método de cromatografía de intercambio aniónico. El término " α -trombina purificada", como se usa en el presente documento, también se refiere a una α -trombina homogénea modificada postraduccionallymente, por ejemplo, una preparación de α -trombina homogéneamente glicosilada y/o sialilada obtenida tras el aislamiento de la α -trombina modificada postraduccionallymente homogéneamente a partir de solución de α -trombina modificada postraduccionallymente heterogéneamente usando un método de cromatografía de intercambio aniónico. El término "glicoforma de α -trombina homogénea purificada", típicamente, se refiere a una preparación de glicoforma de α -trombina homogénea obtenida tras el aislamiento de la glicoforma de α -trombina a partir de polipéptidos de degradación de α -trombina, especies de α -trombina glicosiladas heterogéneas y/u otra proteína presente en la solución que comprende trombina de partida usando un método de cromatografía de intercambio aniónico.

En una realización, la α -trombina purificada es una proteína intacta sin polipéptidos de degradación.

En una realización, la α -trombina purificada es una especie de α -trombina homogénea modificada postraduccionallymente. En otra realización, la α -trombina purificada es una especie de α -trombina no modificada. En otra realización, la α -trombina purificada es una glicoforma de α -trombina homogénea.

Una preparación de α -trombina purificada puede consistir en una especie homogénea modificada postraduccionalmente aislada de una solución que comprende varias α -trombinas modificadas postraduccionalmente. La solución de trombina de partida también puede comprender especies de trombina no modificadas.

La α -trombina modificada postraduccionalmente aislada puede estar glicosilada o glicosilada y sialilada. El grado de glicosilación y/o sialilación puede variar entre las diferentes especies. La antena puede ramificarse en diversos grados, desde biantenaria a pentaantenaria. El ácido siálico puede ser cualquiera de los derivados del ácido neuramínico (ácido 5-amino-3,5-didesoxi-D-*glicero*-D-*galacto*-non-2-ulosónico), como ácido N-acetilneuramínico o ácido N-glicolilneuramínico.

" α -trombina" puede incluir α -trombina no modificada, α -trombina homogénea o heterogénea, α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente, por ejemplo, α -trombina glicosilada homogéneamente o α -trombina homogéneamente glicosilada y sialilada homogéneamente o α -trombina sialilada homogéneamente; y α -trombina heterogéneamente modificada postraduccionalmente, por ejemplo, α -trombina heterogéneamente glicosilada o glicosilada y sialilada. La α -trombina puede provenir de una fuente de sangre y/o plasma de mamífero, por ejemplo, una fuente de plasma humano, bovino o de cerdo o de una fuente recombinante.

En algunas realizaciones, la "otra proteína"/"otras proteínas" es la albúmina de suero humano (HSA) o cualquier otra proteína incluida en una formulación de trombina, por ejemplo, para la estabilización de la formulación. La "otra proteína" es diferente de α , β e γ -trombina. La "otra proteína" puede ser numerosas proteínas que se pueden encontrar en la sangre o en el plasma, como protrombina, inmunoglobulinas, HSA y otras. La otra proteína puede ser un fragmento de proteína. En algunas realizaciones, la otra proteína es un estabilizador tal como albúmina sérica humana y/o albúmina sérica bovina.

El término "cromatografía de intercambio aniónico" se refiere a una técnica de separación en donde las moléculas se separan en función de su carga neta. Los intercambiadores de aniones reciben su nombre por su capacidad para atraer o unir aniones o partículas cargadas negativamente. Los intercambiadores de aniones son bien conocidos en la técnica (cromatografía de proteínas prácticas editada por Kenney y Fowell Volumen 11; Capítulo 16, 249-258; Humana Press, 1992). En los intercambiadores de aniones, la resina tiene carga positiva y una molécula se unirá si el pH del tampón es más alto que el punto isoeléctrico de la proteína. El término "punto isoeléctrico" se refiere al pH en donde una molécula no lleva carga neta. En un medio con un pH por debajo del punto isoeléctrico, la molécula lleva una carga positiva neta, por encima la molécula lleva una carga negativa neta. Los términos "intercambiador de aniones" y "matriz de intercambio de aniones" se usan aquí de manera intercambiable.

Los términos "soporte" y "resina" tal como se usan en el presente documento incluyen un vehículo, o cualquier matriz utilizada para unir, inmovilizar, transportar o estabilizar los grupos cargados positivamente. Los soportes son bien conocidos en la técnica como se describe en Hermanson GT, Mallia AK y Smith PK 1992 "Immobilization Affinity Ligand Techniques" págs. 1-45 Academic Press, Inc. San Diego, Estados Unidos.

El soporte para llevar a cabo el método de la invención puede estar hecho de cualquier material que sea capaz de unir una molécula que comprenda grupos cargados positivamente, es decir, una molécula que comprende grupos químicos que llevan una carga positiva. Los soportes sólidos incluyen, entre otros, matrices, columnas, cubreobjetos, materiales cromatográficos, filtros, portaobjetos de microscopio, tubos de ensayo, viales, botellas, soportes ELISA, superficies de vidrio o plástico, membranas cromatográficas, láminas, partículas, perlas, incluidos las perlas magnéticas, geles, polvos, fibras y similares.

En una realización de la invención, el soporte está en forma de un material cromatográficamente utilizable. En otra realización de la invención, el soporte está en forma de una membrana cromatográfica. El soporte puede estar compuesto de un material hidrófilo como agarosa, sefarosa, perlas acrílicas, celulosa, vidrio de poro controlado, geles de sílice, dextranos; material hidrofóbico; o un polímero orgánico artificial/sintético tal como materiales basados en poliácridamidas o poliestireno. Los materiales/polímeros típicos están disponibles comercialmente bajo los nombres comerciales Sephacryl® (Pharmacia, Suecia), Ultragel® (Biosepara, Francia) TSK-Gel Toyopearl® (Toso Corp., Japón), HEMA (Alltech Ass. (Deer-field, Ill., EE.UU.), Eupergit® (Rohm Pharma, Darmstadt, Alemania). También materiales basados en azlactonas (3M, St. Paul, Minn., EE.UU.). En una realización, el soporte está compuesto de Agarose® o Sepharose®. Estos materiales están disponibles comercialmente. Típicamente, la resina de intercambio aniónico o el polímero de intercambio aniónico es una matriz insoluble (o estructura de soporte) normalmente en forma de pequeñas perlas, fabricadas a partir de un sustrato de polímero orgánico.

En algunas realizaciones del método, las perlas tienen un tamaño de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 μm o por ejemplo 5 μm . Las perlas pueden ser partículas no porosas o porosas. Las perlas pueden ser partículas monodispersas (es decir, de tamaño sustancialmente homogéneo). En una realización, las perlas utilizadas están en el intervalo de 1,7 μm a 10 μm .

El intercambiador de aniones puede ser un intercambiador de aniones débil o fuerte. Un intercambiador de aniones débil generalmente se refiere a un intercambiador que se compone de una base débil, mientras que un intercambiador

de aniones fuerte generalmente se refiere a un intercambiador que se compone de una base fuerte que puede mantener su carga en un rango de pH más amplio.

En algunas realizaciones del método, los grupos cargados positivamente se seleccionan del grupo que consiste en amonio, alquilamónio, dialquilamónio, trialquilamónio, amonio cuaternario, grupos alquilo, H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , grupo funcional amino y una combinación de los mismos.

Las perlas de resina se pueden suspender en un medio apropiado y la suspensión resultante se puede usar, por ejemplo, en una columna cromatográfica denominada en este documento "purificación de columna". Alternativamente, la columna se puede comprar en forma preempacada.

La "purificación de columna" y la "cromatografía en columna" generalmente se refieren a una técnica en donde se permite que una solución (la fase móvil) viaje a través de una columna que comprende una resina empaquetada a un cierto caudal, y un componente individual o un número de componentes son adsorbidos por la resina (la fase estacionaria), es decir, por el material cromatográfico. El material no unido se puede recoger del otro lado de la columna después de que la mezcla haya pasado a través de ella. Al usar ciertas condiciones de elución, es posible alterar el enlace entre los diferentes compuestos y la fase estacionaria, lo que conduce a la elución de un compuesto específico y purificado de la columna, uno a la vez. La purificación de columna es bien conocida en la técnica como se describe en Practical Protein Chromatography editado por Kenney y Fowell Volumen 11; Capítulo 16, 249 Humana Press, 1992.

Típicamente, se vierte una suspensión de resina en la columna. Después de que se asiente, la columna se equilibra previamente en el tampón antes de aplicar la mezcla/solución de proteínas. Alternativamente, se puede comprar una columna preempacada. Las proteínas no unidas aparecen en el flujo y/o en los lavados de tampón posteriores. Las proteínas que se unen a la resina se retienen y pueden eluirse mediante: sal o ajuste de pH/polaridad. El término "material no unido"/"fracción no unida" se refiere típicamente a la fracción descartada después del lavado de la columna cargada, por ejemplo, con el mismo tampón usado para el equilibrio y/o el tampón usado para cargar la solución que contiene trombina en la columna ("tampón de unión"). "Una solución no isocrática" se usa como condiciones de elución. Una "solución no isocrática" típicamente se refiere, por ejemplo, a una solución y/o una condición que es diferente de la solución y/o condición utilizada para cargar, lavar y/o equilibrar la columna; y/o a una solución que es diferente de una solución utilizada en un paso anterior. Las condiciones de elución emplean un cambio en la composición de la fase móvil, por lo que cambia el entorno de unión de factores creado por el tampón de unión.

Generalmente, el equilibrio se lleva a cabo hasta que se estabilizan las lecturas de pH y/o conductividad y/o UV. En una realización, el equilibrio se lleva a cabo con >5 volúmenes de columna de tampón. En otra realización, el equilibrio se lleva a cabo con 1 a 5 volúmenes de columna de tampón.

El término "condiciones de elución" se refiere al uso de una condición no isocrática, p. ej. una solución y/o condición diferente de la solución y/o condición utilizada para cargar y/o equilibrar la columna; y/o diferente de la solución utilizada en un paso anterior. La solución y/o las condiciones utilizadas en el punto de partida y/o en el punto final de la etapa de elución (por ejemplo, la elución en gradiente) pueden ser idénticas a la solución y/o las condiciones utilizadas durante las etapas de lavado, carga y/o regeneración. El término "condiciones de elución" también puede referirse a una elución en gradiente durante la cual se produce la concentración de sal y/o cambios en el pH/polaridad. Las condiciones de elución son tales que las proteínas y los polipéptidos de degradación se separan y eluyen diferencialmente. El método según la invención comprende al menos una etapa de elución con una solución no isocrática. Las condiciones de elución, típicamente implican un aumento en la concentración de sal y/o cambios en el pH/polaridad. Se encontró aquí que usar un gradiente de pH para la elución es eficiente.

En algunas realizaciones de los métodos, el método consiste en un paso de cromatografía, es decir, un solo paso de cromatografía.

Típicamente, el término "método cromatográfico de un paso" o "un paso de cromatografía" o "cromatografía de intercambio aniónico de un paso" se refiere a un método que permite la purificación y/o cuantificación de la trombina α ; trombina homogénea o heterogénea; α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente, por ejemplo, α -trombina glicosilada homogéneamente o α -trombina sialilada homogéneamente glicosilada y homogéneamente; α -trombina no modificada; α -trombina heterogéneamente modificada postraduccionalmente, por ejemplo, polipéptidos de degradación de trombina y/o trombina heterogéneamente glicosilados o glicosilados y sialilados; o β -trombina que se lleva a cabo por el intercambiador de aniones directamente en un material de muestra sin etapas cromatográficas y/o de separación adicionales.

En una realización de la invención, se utiliza la purificación en columna. En otra realización, se usa un método de cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico. La columna puede regenerarse después de la elución de los ingredientes de la solución para uso repetitivo. El tiempo de ejecución total desde la carga hasta la regeneración puede estar en el rango de 30 a 120 minutos, por ejemplo, aproximadamente 46, 55 minutos. En una realización, la separación por gradiente dura 28,6 minutos.

La separación según la invención se lleva a cabo empleando condiciones de elución diferenciales. El término "condiciones de elución diferencial" se refiere a condiciones que permiten la separación de α -trombina de sus polipéptidos de degradación y/o de otra proteína; separación de una especie de α -trombina modificada postraduccionalmente homogénea de polipéptidos de degradación de la trombina, otra proteína y/o especies heterogéneas de α -trombina modificadas postraduccionalmente; separación de una glicofoma de α -trombina homogénea de especies heterogéneas de α -trombina modificadas postraduccionalmente p. ej. especies de α -trombina glicosiladas; separación de una glicofoma de α -trombina homogénea de al menos uno de los polipéptidos de degradación de α -trombina, otra proteína o especies heterogéneas de α -trombina modificadas postraduccionalmente; y/o separación de β -trombina de α -trombina, γ -trombina y/u otra proteína.

Las condiciones de elución pueden implicar alteraciones en el pH del tampón de elución. En una realización, las condiciones de elución diferencial comprenden alteraciones en el pH, por ejemplo, un gradiente de pH. En una realización, las resinas usadas según la invención son adecuadas para trabajar en un intervalo de pH según la invención. En una realización, las resinas son adecuadas para ser sometidas a materiales orgánicos (tales como metanol y/o acetonitrilo).

El volumen de la columna puede estar en el rango de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 53 ml. En una realización de la invención, el volumen de la columna es de aproximadamente 4,1 ml, por ejemplo, 4,15 ml. En otra realización, la mayoría de los picos se recogen dentro de un volumen de columna.

En una realización adicional, el método es un método analítico, por ejemplo, método analítico fisicoquímico, y puede llevarse a cabo como un método cromatográfico de un solo paso.

En algunas realizaciones, el método incluye además identificar las fracciones separadas que contienen α -trombina, β -trombina y/o γ -trombina.

En algunas realizaciones, el método incluye además identificar la diferente α -trombina modificada postraduccionalmente. Las diferentes glicosilaciones pueden analizarse utilizando espectroscopía de masas, electroforesis capilar, mediante el uso de diferentes métodos de HPLC o por cualquier otro método conocido en la técnica.

En una realización, las diferentes fracciones/picos se identifican visualmente después de inyectar el conjunto de muestra. Típicamente, el perfil de los picos es robusto y, por lo tanto, cada pico se puede identificar fácilmente. En otra realización, los diferentes picos de trombina se identifican inyectando en los estándares de trombina HPLC α , β e γ , e identificando los picos de correlación de la solución de trombina. En otra realización, los diferentes picos de trombina se identifican mediante análisis de transferencia Western ejecutando los picos eluidos contra los estándares de trombina α , β e γ y/o en base al tamaño molecular conocido de α , β e γ -trombina. En este documento se proporciona un método cromatográfico de un solo paso para cuantificar la trombina en una solución que comprende la α -trombina y al menos uno de un polipéptido de degradación de α -trombina u otra proteína, el método comprende los pasos de: separar la α -trombina del al menos uno del polipéptido de degradación de α -trombina u otra proteína en cromatografía de intercambio aniónico por condiciones de elución diferencial; recolectar una fracción de α -trombina; y cuantificar la α -trombina.

En el presente documento se proporciona un método cromatográfico de un solo paso para cuantificar una α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente (por ejemplo, glicofoma homogénea) en una solución que comprende una α -trombina heterogénea modificada postraduccionalmente y opcionalmente al menos uno de un polipéptido de degradación de α -trombina u otra proteína, comprendiendo el método los pasos de: separar la trombina homogénea modificada postraduccionalmente de la solución en cromatografía de intercambio aniónico por condiciones de elución diferencial como se describe en las reivindicaciones; recoger la fracción de α -trombina modificada postraduccionalmente homogénea; y cuantificar la α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente.

En el presente documento se proporciona un método cromatográfico de un solo paso para cuantificar la trombina en una solución que comprende la α -trombina y al menos uno de un polipéptido de degradación de α -trombina u otra proteína, comprendiendo el método los pasos de: poner en contacto la solución con un intercambiador de aniones; separar la α -trombina del al menos uno de los polipéptidos de degradación de α -trombina y/o la otra proteína en cromatografía de intercambio aniónico mediante condiciones de elución diferencial; y cuantificar la α -trombina.

En alguna realización, el método comprende separar la α -trombina de al menos uno de los polipéptidos de degradación de α -trombina y la otra proteína en la cromatografía de intercambio de aniones por condiciones de elución diferencial. En algunas realizaciones, el método incluye además cuantificar uno o más polipéptidos de degradación, por ejemplo, polipéptidos de β -trombina y/o γ -trombina.

Además, en este documento se proporciona un método cromatográfico de un solo paso para cuantificar α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente en una solución que comprende α -trombina heterogénea modificada postraduccionalmente; y opcionalmente al menos uno de un polipéptido de degradación de α -trombina u otra proteína, comprendiendo el método los pasos de: poner en contacto la solución con un intercambiador aniónico; separar la α -

trombina modificada postraduccionalmente homogénea de la α -trombina modificada postraduccionalmente heterogénea; y opcionalmente al menos uno del polipéptido de degradación de α -trombina y/o la otra proteína; en cromatografía de intercambio aniónico por condiciones de elución diferencial; y cuantificar la α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente. En una realización, la solución comprende al menos uno de polipéptidos de degradación de α -trombina (β -trombina y/o γ -trombina); y/u otra proteína.

En algunas realizaciones, la solución comprende además al menos uno de un polipéptido de degradación de trombina u otra proteína, y el método incluye separar la α -trombina modificada postraduccionalmente homogénea también de al menos uno de los polipéptidos de degradación de α -trombina y/o la otra proteína. En algunas realizaciones, el método incluye separar α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente de al menos uno de los polipéptidos de degradación de α -trombina y la otra proteína.

La cuantificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, calculando la integración, p. ej. midiendo el área bajo el pico de un cromatograma. Los picos se pueden cuantificar ya sea integrando el pico y comparando el área del pico con el área total eluida o evaluando la altura del pico. El área o la altura se pueden traducir a números absolutos si se usa un estándar o se puede evaluar el área de pico relativa.

Las condiciones de elución incluyen aplicar un gradiente de pH. En algunas realizaciones de los métodos, la etapa de separación incluye la aplicación de condiciones de elución diferencial. En algunas realizaciones, las condiciones de elución incluyen la aplicación de un gradiente de pH. En algunas realizaciones, las condiciones de elución incluyen la aplicación de un gradiente de pH lineal. Típicamente, un gradiente de pH lineal se define como un gradiente que cambia gradualmente e igualmente el pH con el tiempo. En algunas realizaciones, el gradiente de pH es de aproximadamente pH 9,1 a aproximadamente pH 3,4. En algunas realizaciones, el gradiente de pH lineal se genera usando un eluyente que comprende una amina o una mezcla de aminas. En algunas realizaciones, el eluyente comprende una mezcla de aminas. En algunas realizaciones, el tampón Basado en amina comprende piperazina, trietanolamina, bis-tris propano, 1-metilpiperazina y una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, la concentración de cada amina en el tampón está en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mM, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mM o aproximadamente 20 mM. Se pueden usar tampones con características similares, adecuados para la creación de un gradiente de pH, por ejemplo, tampones de fosfato a diferentes valores de pH. Los compuestos alternativos, no enumerados aquí, pueden usarse para construir un sistema tampón adecuado para la elución de trombina de un intercambiador aniónico.

Los resultados muestran que AEX-HPLC y elución usando un gradiente lineal entre pH 9,1 y pH 3,4 conduce a una buena resolución entre HSA, acetiltriprófano, polipéptidos de degradación de α -trombina y α -trombina. Por consiguiente, en una realización, se usa una etapa de elución de gradiente de pH lineal entre pH 9,1 y pH 3,4 como condiciones de elución diferencial. En una realización, la HPLC comprende una etapa de carga de 5 minutos, a un caudal de ml/min; en un paso de elución con gradiente de pH lineal de 20 minutos, a una velocidad de flujo de 0,80 ml/min, el gradiente de pH lineal se genera utilizando dos tampones de eluyente que comprenden la misma mezcla de aminas, la concentración del tampón A disminuye del 90% al 0% y tampón B aumenta de 10% a 100%, el incremento de tampón B es de 4,5% por minuto. En otra realización, la HPLC comprende una etapa de equilibrio de columna de 15 minutos, a una velocidad de flujo de 0,80 ml/min. En otra realización, la HPLC comprende una etapa de regeneración de columna de 5 minutos, a una velocidad de flujo de 0,80 ml/min.

En algunas realizaciones, la temperatura durante la etapa de elución está en el intervalo de aproximadamente 10°C a aproximadamente 50°C, por ejemplo, aproximadamente 25°C.

En algunas realizaciones, la velocidad de flujo durante la etapa de elución de gradiente de pH lineal es 0,25, 0,5, 0,75 y 1 ml/min. Los resultados muestran que la resolución entre la trombina y sus polipéptidos de degradación aumenta al aumentar las tasas de flujo y que la mejor resolución se logró a una tasa de flujo de 1,0 mL/min. Por consiguiente, en una realización, la velocidad de flujo durante la etapa de elución de gradiente de pH lineal es superior a 0,75 ml/min, por ejemplo, aproximadamente 1,0 ml/min.

Los resultados muestran que eluir las proteínas de la columna con un rango de pH más amplio conduce a una mejor separación entre los picos. Por consiguiente, en una realización, se genera una etapa de elución de gradiente de pH lineal usando dos tampones eluyentes que comprenden la misma mezcla y concentraciones de aminas, la concentración de gradiente de tampón A disminuye de 100% a 0% y el tampón B aumenta de 0% a 100%, el incremento del tampón B es aproximadamente 4,5% por minuto. En tal realización, la etapa de elución de gradiente de pH lineal puede ser de aproximadamente 22 minutos.

El tiempo de ejecución total desde la carga de la solución de trombina en la columna y hasta el paso de regeneración de columna (por ejemplo, que incluye pasos de carga, un paso de elución de gradiente lineal, un paso de regeneración de columna y un paso de equilibrio de columna) puede estar en el rango de 120 minutos, por ejemplo, en el rango de 46 a 61 minutos, como aproximadamente 46, 51, 56 y 61 minutos de tiempo total de ejecución, y el paso de elución puede estar en el rango de 20 a 35 minutos, por ejemplo, aproximadamente 20, 25, 30 y 35 minutos. Los resultados muestran que a 56 y 61 minutos de tiempo de ejecución total (una longitud de paso de elución en gradiente de 30 y 35 minutos), se separó un pico de elución adicional en una región distinta de los picos de trombina en comparación

con los tiempos de ejecución más cortos. En consecuencia, en una realización, se lleva a cabo una etapa de elución de gradiente lineal de más de 25 minutos.

Los resultados muestran que la elución con un gradiente lineal de pendiente de pH de 4,5%, 4,25%, 4%, 3,75%, y 3,5% por minuto fue eficaz en la separación de los diferentes picos de trombina con un incremento de 3,5% con el mejor perfil de separación. El gradiente de pendiente puede verse afectado por el incremento del porcentaje de tampón B por minuto cuando se usa más de un tampón como tampón eluyente. Típicamente, un aumento menor del porcentaje de tampón B por minuto da como resultado una pendiente más superficial en comparación con un aumento mayor del porcentaje de tampón B por minuto, lo que afecta el perfil de elución de las proteínas. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la elución se lleva a cabo a un gradiente de pH lineal entre 100% de tampón A a 100% de tampón B con una pendiente de 3,5-4,5% de tampón B por minuto, por ejemplo, a una pendiente del 3,5%.

En algunas realizaciones, la solución de partida (para ser purificada y/o cuantificada) que comprende la α -trombina además comprende otra proteína y carece sustancialmente de polipéptidos de degradación (por ejemplo, la solución contiene menos del 10% p/p de β -trombina y/o γ -trombina en relación con la cantidad total de trombina).

En algunas realizaciones, la solución de partida que comprende la α -trombina comprende además polipéptidos de degradación, por ejemplo, β -trombina y/o γ -trombina. En algunas realizaciones, la solución de partida que comprende la α -trombina comprende además polipéptidos de degradación sin la otra proteína.

En algunas realizaciones, la solución de partida que comprende la α -trombina comprende además polipéptidos de degradación (por ejemplo, β -trombina y/o γ -trombina), y otra proteína.

En algunas realizaciones, la solución inicial que comprende la β -trombina adicional comprende α -trombina y carece de γ -trombina y/u otra proteína. En algunas realizaciones, la solución inicial que comprende la β -trombina además comprende γ -trombina y carece de α -trombina y/u otra proteína. En algunas realizaciones, la solución de partida que comprende la β -trombina comprende además otra proteína y carece de α -trombina y/o γ -trombina. En algunas realizaciones, la solución de partida que comprende la β -trombina comprende además α -trombina, y γ -trombina y carece de otra proteína. En algunas realizaciones, la solución de partida que comprende la β -trombina comprende además α -trombina, y otra proteína y carece de γ -trombina. En algunas realizaciones, la solución de partida que comprende la β -trombina comprende además γ -trombina y otra proteína y carece de α -trombina. En algunas realizaciones, la solución de partida que comprende la β -trombina comprende además α -trombina, γ -trombina y otra proteína.

La solución de partida puede comprender α -trombina heterogénea modificada postraduccionalmente y/o α -trombina no modificada. En algunas realizaciones, la solución de partida comprende otra proteína. En algunas realizaciones, la solución inicial carece de otras proteínas.

La concentración de trombina en la solución puede estar en el rango de aproximadamente 2 a aproximadamente 10000 UI/ml, de aproximadamente 100 a aproximadamente 10000 UI/ml, de aproximadamente 2 a aproximadamente 4000 UI/ml, aproximadamente 800 a aproximadamente 3000 UI/ml o aproximadamente 800 a aproximadamente 1200 UI/ml y la concentración de proteína total puede estar en el rango de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 55 mg/ml, aproximadamente 0,3 a aproximadamente 10 mg/ml o aproximadamente 1 a aproximadamente 7 mg/ml. En algunas realizaciones, 1000 UI/ml es igual a 0,3 mg/ml. La solución puede estar a un pH en el intervalo de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,1, y puede comprender entre 5,0 a 6,5 mg/ml de albúmina sérica humana (HSA) y/u otros estabilizadores tales como acetiltriptófano.

Una solución que comprende α -trombina puede ser una solución que comprende una formulación de trombina o una trombina formulada (por ejemplo, una solución de trombina que comprende excipientes y/o estabilizadores), por ejemplo, un medicamento, por ejemplo, con una actividad de trombina en el rango de 800-1200 UI/ml, una concentración de proteína total de aproximadamente 5,7-6,5 mg/ml, y 5,0 a 6,5 mg/ml de albúmina de suero humano (HSA) a pH 6,9-7,1. La formulación de trombina puede incluir otros estabilizadores, por ejemplo, acetiltriptófano. En una realización, el HSA usado para la formulación de trombina incluye un estabilizador, acetiltriptófano.

Como se usa en el presente documento, los términos "excipiente" se refieren a una sustancia inerte que se agrega a la composición farmacéutica. Los ejemplos de excipientes incluyen, pero no se limitan a, albúmina humana, manitol, acetato de sodio y agua para inyección. La albúmina humana en la solución puede estar en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mg/ml. El manitol puede estar en el rango de concentración de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 mg/ml. El acetato de sodio también se agrega en la solución en el rango de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 mg/ml.

En una realización, la solución de trombina comprende aproximadamente 3000 UI/ml de trombina, una concentración de proteína total de aproximadamente 1 mg/ml, acetato de sodio 20 mM a pH 6,9-7,1. En otra realización, la formulación de trombina comprende trombina en el rango de 800-1200 UI/ml, una concentración de proteína total de aproximadamente 5,7-6,5 mg/ml y 5,0 a 6,5 mg/ml de albúmina sérica humana (HSA) a pH 6,9-7,1.

La solución puede comprender cloruro de calcio. La concentración de cloruro de calcio en la solución puede estar en el rango de aproximadamente 2 a aproximadamente 6,2 mg/ml, o en el rango de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 6,2 mg/ml, tal como en la concentración de 5,88 mg/ml.

5 La actividad de coagulación de trombina se puede medir directamente, por ejemplo, por el procedimiento de ensayo de farmacopea europea (0903/1997), midiendo la longitud de migración en una superficie inclinada (o modelo de prueba de caída), y/o por cualquier otro método conocido en la técnica.

10 La actividad de la trombina se puede determinar utilizando un analizador de coagulación con un sistema de detección de punto final mecánico para detectar la formación de coágulos, como el Diagnostica Stago ST4 Coagulation Analyzer, o un dispositivo que mide los cambios en la turbidez debido a la formación de coágulos de fibrina.

15 Otro método por el cual se puede medir la actividad de la trombina es usar un sustrato de péptido cromogénico o fluorogénico para la trombina. A menudo, en este método, la trombina solubilizada se combina con un exceso de sustrato cromogénico o fluorogénico. La trombina escindirá el sustrato liberando un cromóforo o fluoróforo que se puede controlar en un espectrofotómetro o fluorímetro. Ejemplos de sustratos cromogénicos o fluorogénicos incluyen β -Ala-Gly-Arg-p-diacetato de nitroanilida y Z-Gly-Pro-Arg-AMC [Z=benciloxicarbonilo; AMC=7-amino-4-metilcumarina], respectivamente. La tasa de cromóforo o fluoróforo liberado puede correlacionarse con la actividad de la trombina.

20 La trombina se puede preparar a partir de una composición sanguínea. La composición de la sangre puede ser sangre entera o fracciones de sangre, es decir, una fracción de sangre completa como el plasma. El origen de la trombina puede ser autólogo, por lo que se fabricaría a partir de la propia sangre del paciente, de sangre o fracciones agrupadas. La solución de trombina puede ser preparada a partir de plasma de seres humanos o mamíferos. En una realización, la trombina se prepara por métodos recombinantes en células procariotas.

25 En una realización, la solución de trombina puede formularse como una solución estéril, pH 6,8-7,2, que contiene trombina humana altamente purificada. La formulación de trombina puede contener: trombina humana (800-1200 UI/ml), cloruro de calcio, albúmina humana, manitol, acetato de sodio y agua para inyección. En una realización, la trombina se fabrica por purificación cromatográfica de protrombina a partir de plasma crío-pobre seguido de activación con cloruro de calcio, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. 5,143,838, que se incorpora aquí como referencia.

35 En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un método analítico de un solo paso para cuantificar la trombina en la trombina formulada (por ejemplo, un producto farmacológico) que incluye la α -trombina y otra proteína (por ejemplo, albúmina sérica humana), comprendiendo el método los pasos de: poner en contacto la trombina formulada con un intercambiador aniónico; separar la trombina de la otra proteína en cromatografía de intercambio aniónico por condiciones de elución diferencial; y cuantificar la α -trombina. En algunas realizaciones, las condiciones de elución diferencial comprenden un gradiente de pH, por ejemplo, generado usando un eluyente que comprende una amina o una mezcla de aminas. En algunas realizaciones, se utiliza un método de cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico. En algunas realizaciones, el intercambiador aniónico está hecho de partículas no porosas. En algunas realizaciones, la trombina formulada comprende además polipéptidos de degradación de α -trombina no deseados (polipéptidos de β -trombina y/o γ -trombina), y el método incluye separar la trombina de los polipéptidos de degradación. En algunas realizaciones, la trombina formulada no contiene polipéptidos de degradación.

45 Como se usa en este documento, los artículos indefinidos "un" y "una" significan "al menos uno" o "uno o más" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

50 Como se usa en el presente documento, los términos "que comprende", "que incluye", "que tiene" y las variantes gramaticales de los mismos deben tomarse como especificación de las características, pasos o componentes establecidos, pero no excluyen la adición de una o más características, pasos, componentes adicionales o grupos de los mismos.

55 Cuando un valor numérico está precedido por el término "aproximadamente", el término "aproximadamente" pretende indicar $\pm 10\%$.

60 La "trombina" o "polipéptido de trombina" es una serín proteasa de mamífero que forma parte de la cascada de coagulación sanguínea y convierte el fibrinógeno en hebras insolubles de fibrina, además de catalizar otras reacciones relacionadas con la coagulación. En humanos, la protrombina está codificada por el gen F2, y el polipéptido resultante se escinde proteolíticamente en la cascada de coagulación por el Factor Xa con un cofactor (FVa) u otras serín proteasas para generar trombina. La trombina sirve, entre otras cosas, como un componente activo en varios productos de hemostasia. Por ejemplo, los selladores de fibrina comprenden típicamente un componente de fibrinógeno y un componente de trombina. Cuando ambos componentes se mezclan (por ejemplo, cuando se aplica a una herida sangrante) la trombina escinde el fibrinógeno y un polímero de fibrina formado que tiene características hemostáticas. El sellador de fibrina es típicamente un producto sanguíneo obtenido de fuentes comerciales o de algunos centros regionales de transfusión de sangre. Los componentes que se usan comúnmente en la preparación

de colas de fibrina son fibrinógeno, trombina, Factor VIII, Factor XIII, fibronectina, vitronectina y factor de von Willebrand (vWF). El sellador de fibrina se forma típicamente por una reacción enzimática que implica, entre otros, fibrinógeno, trombina y factor XIII. Los términos "sellador de fibrina" y "pegamento de fibrina" son intercambiables.

La trombina humana es una proteína de 295 aminoácidos compuesta de dos cadenas de polipéptidos, A y B, unidos por un enlace disulfuro. La cadena B de la α -trombina es responsable de la actividad proteolítica de la trombina sobre el fibrinógeno y otras proteínas y de su actividad autolítica que conduce a los polipéptidos de degradación de la β -trombina y la γ -trombina. La escisión de la cadena B en el enlace Arg106-Tyr107 produce un fragmento B1 de 70 aminoácidos y la forma β -trombina (B2) de 188 aminoácidos. La γ -trombina se genera mediante la escisión adicional de la cadena β -trombina B2 en el enlace Lys190-Gly191. Por lo general, estas formas proteolizadas de trombina tienen una capacidad reducida para convertir el fibrinógeno en hebras insolubles de fibrina que α -trombina intacta.

La cadena B de α -trombina humana se modifica adicionalmente después de la traducción, por ejemplo, por glicosilación, posiblemente dando como resultado una forma de trombina más potente y/o estable en comparación con una forma no modificada y/o en comparación con otra forma de modificación postraducciona (como se indica por Ricardo J. Sola y Kai Griebenow. "Glycosylation of Therapeutic Proteins: An Effective Strategy to Optimize Efficacy" BioDrugs. 2010; 24(1): 9-21 para otras proteínas glicosiladas). La α -trombina madura tiene un único sitio de glicosilación enlazado en su "cadena pesada". El ácido siálico, también conocido como ácido neuramínico, es crítico para la biodisponibilidad, función, estabilidad y metabolismo de la glicoproteína. La forma glicosilada de α -trombina (en la α -trombina humana natural madura, residuo de aminoácido N416) puede sialilarse adicionalmente con 1 a 5 residuos de ácido siálico. Por consiguiente, la α -trombina puede contener diferentes grados/niveles de sialilación, p. ej. la α -trombina puede variar en la cantidad de residuos de ácido N-acetilneuramínico (NANA) (ácido siálico) en el sitio de glicosilación. El grado de sialilación puede influir en la potencia y estabilidad de la proteína. Típicamente, cuanto mayor es el nivel de sialilación, mayor es la potencia y mayor es la estabilidad.

Los resultados muestran que la separación de α -trombina por cromatografía de intercambio aniónico permite la separación de numerosos picos de α -trombina que contienen diferentes cantidades de NANA. Los resultados muestran que el tratamiento de la trombina con N-acetilneuraminidasa, una enzima capaz de eliminar los residuos NANA del extremo terminal de los glicanos, afecta el perfil de elución de la trombina, lo que resulta en un desplazamiento general de los picos hacia el lado izquierdo del cromatograma (en comparación con una trombina no tratada). Por consiguiente, el método de la invención puede usarse para purificar y/o cuantificar diferentes glicoformas de α -trombina, por ejemplo, que tienen diferencias en el contenido de NANA. En una realización, el método de acuerdo con la invención puede usarse para purificar/aislar diferentes especies homogéneas de trombina que contienen un perfil sustancialmente idéntico de NANA usando AEX-HPLC. En otra realización, se puede usar el método de acuerdo con la invención para purificar/aislar homogéneamente α -trombina modificada postraduccionalmente de una solución proteínica y/o de una solución que comprende trombina modificada postraduccionalmente heterogéneamente.

La "modificación postraducciona" es un paso en la biosíntesis de proteínas. Las proteínas son creadas por ribosomas que traducen ARNm en cadenas de polipéptidos. Las cadenas de polipéptidos experimentan modificaciones postraduccionales, por ejemplo, corte, plegamiento y otros procesos, antes de que maduren en el producto proteico final.

Después de la traducción, la modificación postraducciona de los aminoácidos amplía el rango de funciones de la proteína al unirla a otros grupos funcionales bioquímicos, cambiar la naturaleza química de un aminoácido o realizar cambios estructurales (p. ej. formación de puentes disulfuro). Las modificaciones pueden ser glicosilación, fosforilación, ubiquitinación, metilación, nitrosilación, acetilación, lipidación. Típicamente, las modificaciones controlan el comportamiento de una proteína, por ejemplo, activando o inactivando una enzima.

Típicamente, la glicosilación tiene un efecto significativo sobre el plegamiento de proteínas, la conformación, la distribución, la estabilidad y la actividad. La glicosilación incluye la adición de un resto de azúcar a las proteínas que varía desde simples modificaciones de monosacáridos de factores de transcripción nuclear hasta cambios de polisacáridos ramificados altamente complejos. La fosforilación desempeña un papel fundamental en la regulación de muchos procesos celulares, incluidos el ciclo celular, el crecimiento, la apoptosis y las vías de transducción de señales. La metilación, la transferencia de 20 grupos metilo de un carbono a nitrógeno u oxígeno (metilación de N y O, respectivamente) a las cadenas laterales de aminoácidos aumenta la hidrofobicidad de una proteína y puede neutralizar una carga de aminoácidos negativa cuando se une a ácidos carboxílicos. Ubiquitinación, ubiquitina es un polipéptido 8-kDa que consta de 76 aminoácidos que se añade al μ -NH₂ de lisina en una proteína diana a través de la glicina C-terminal de ubiquitina. Las proteínas poliubiquitinadas son reconocidas por el proteasoma 26S que cataliza la degradación de la proteína ubiquitinada y el reciclaje de la ubiquitina. La metilación es un mecanismo bien conocido de regulación epigenética, ya que la metilación y la desmetilación de histonas influyen en la disponibilidad de ADN para la transcripción. Los residuos de aminoácidos pueden conjugarse con un solo grupo metilo o múltiples grupos metilo para aumentar los efectos de la modificación.

Una "trombina a no modificada" se refiere a una α -trombina que no sufrió modificaciones postraduccionales, por ejemplo, α -trombina no glicosilada y/o por lo tanto no dializada.

Una "α-trombina homogénea, modificada postraduccionalmente" se refiere a una forma sustancialmente idéntica de α-trombina, por ejemplo, con respecto a la glicosilación y/o el nivel de sialilación. La homogeneidad entre las diferentes moléculas de α-trombina se expresa por tener la misma modificación postraduccionale, por ejemplo, la misma glicosilación, sin embargo, cada molécula de trombina puede poseer diferentes niveles y/o formas de otras modificaciones. La α-trombina puede ser una forma glicosilada y/o sialilada de α-trombina. En una realización, la α-trombina homogénea está glicosilada homogéneamente. En otra realización, la α-trombina homogénea está sialilada homogéneamente. La α-trombina glicosilada puede tener de 0 a 5 residuos de ácido siálico. En algunas realizaciones, la trombina homogénea modificada postraduccionalmente es una α-trombina sialilada que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 residuos de ácido siálico.

Como se usa en el presente documento, las poblaciones de trombina modificadas postraduccionalmente diferentes/heterogéneas de α-trombina y α-trombina no modificada también se conocen como "especies de trombina diferentes". La α-trombina heterogénea modificada postraduccionalmente puede poseer diferentes formas de glicosilación y/o sialilación.

Como se usa en el presente documento, una "glicoforma de α-trombina" se refiere a una especie de α-trombina glicosilada y/o sialilada homogéneamente.

En algunas realizaciones, la α-trombina que se prepara usando el método descrito aquí es homogénea a un nivel de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o al menos 100% de identidad. Por ejemplo, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 o menos que 100%, incluyendo cualquier rango entre los porcentajes divulgados, como 50-55%, 50-60%, 50-65%, 50-70%, 50-75%, 50-80%, 50-85%, 50-90%, 50-95%, 50-99%, 50-100%, 55-60%, 55-65%, 55-70%, 55-75%, 55-80%, 55-85%, 55-90%, 55-95%, 55-99%, 55-100%, 60-65%, 60-70%, 60-75%, 60-80%, 60-85%, 60-90%, 60-95%, 60-99%, 60-100%, 65-70%, 65-75%, 65-80%, 65-85%, 65-90%, 65-95%, 65-99%, 65-100%, 70-75%, 70-80%, 70-85%, 70-90%, 70-95%, 70-99%, 70-100%, 75-80%, 75-85%, 75-90%, 75-95%, 75-99%, 75-100%, 80-85%, 80-90%, 80-95%, 80-99%, 80-100%, 85-90%, 85-95%, 85-99%, 85-100%, 90-95%, 90-99%, 90-100%, 95-99%, 95-100% identidad.

La presente descripción proporciona un método para aislar una población/especie homogénea de α-trombina, por ejemplo, una α-trombina homogénea modificada postraduccionalmente. Además, se describe una población homogénea purificada de α-trombina y una formulación que comprende la trombina homogénea aislada modificada postraduccionalmente; y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto más, se describe aquí una formulación que comprende trombina purificada o una α-trombina homogénea modificada postraduccionalmente aislada como se describe en este documento. En algunas realizaciones, la α-trombina purificada o la α-trombina homogénea aislada modificada postraduccionalmente se obtiene mediante los métodos descritos en este documento. En algunas realizaciones, la α-trombina purificada o la α-trombina homogénea aislada modificada postraduccionalmente se puede obtener mediante los métodos descritos en este documento. En algunas realizaciones de la formulación, la α-trombina es de fuente de plasma de mamífero. En algunas realizaciones, la formulación comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La formulación descrita en el presente documento puede congelarse o liofilizarse.

La formulación que comprende la α-trombina purificada o la α-trombina homogénea modificada postraduccionalmente se puede aplicar a una superficie en un sujeto. La formulación se puede aplicar con una solución que comprende fibrinógeno. La formulación puede usarse, por ejemplo, en hemostasia, fijación de tejido, fijación de injerto, cicatrización de heridas y anastomosis.

En otro aspecto más, se describe en el presente documento una formulación que comprende β-trombina purificada como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la β-trombina purificada se obtiene por los métodos descritos aquí. La formulación que comprende la β-trombina purificada se puede aplicar a una superficie en un sujeto. La formulación se puede aplicar con una solución que comprende fibrinógeno. La formulación puede usarse, por ejemplo, en hemostasia, fijación de tejido, fijación de injerto, cicatrización de heridas y anastomosis.

El término "β-trombina purificada", típicamente, se refiere a una preparación de β-trombina obtenida después del aislamiento de β-trombina a partir de α-trombina, γ-trombina y/u otra proteína presente en la solución que comprende la trombina inicial usando un método de cromatografía de intercambio aniónico. Por "aislado" se entiende generalmente, cuando se hace referencia a "α-trombina aislada modificada postraduccionalmente" o "3-trombina aislada", que la molécula o compuesto indicado es separado y discreto de todo el organismo con el cual la molécula o compuesto se encuentra en la naturaleza y/o está suficientemente libre de otras moléculas para que la molécula se pueda usar para el propósito previsto.

Un "vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable" se refiere a reactivos, compuestos, materiales, composiciones, diluyentes que son compatibles con los constituyentes en la formulación y adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, u otra complicación acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para usar con la formulación descrita en el presente documento puede ser un material líquido, semisólido y sólido. Un portador puede

ser una esponja, película, yeso, vendaje quirúrgico o una venda.

En otro aspecto, se describe aquí un método para el tratamiento hemostático, sellado, fijación de injerto, cicatrización de heridas, anti-adhesión y/o anastomosis en un sujeto que lo necesite, que comprende aplicar al sujeto una cantidad efectiva de una formulación de acuerdo con la invención. Los términos "una cantidad terapéuticamente efectiva" o "una cantidad efectiva" se refieren a la dosis requerida para prevenir o tratar (aliviar un síntoma o todos los síntomas) una enfermedad, trastorno o afección. La cantidad efectiva se puede medir en función de cualquier cambio en el curso de la enfermedad en respuesta a la administración de la formulación. La dosis efectiva se puede cambiar dependiendo de la edad y el peso del sujeto, la enfermedad y su gravedad (por ejemplo, etapa temprana o avanzada) y otros factores que pueden ser reconocidos por los expertos en la materia.

En otro aspecto, se proporciona aquí un método para seleccionar compuestos para su uso potencial en la estabilización de la actividad de trombina en una formulación de trombina líquida acuosa, comprendiendo el método los pasos de: incubar compuestos de prueba con una solución que comprende α -trombina durante un tiempo dado; después de la incubación, cuantificando la α -trombina y/o los polipéptidos de degradación (por ejemplo, polipéptidos de β -trombina y/o γ -trombina) de acuerdo con el método divulgado aquí; e identificar uno o más compuestos de prueba adecuados que tienen un uso potencial en la estabilización de la actividad de la trombina, en donde un compuesto adecuado es un compuesto que mantiene el contenido de α -trombina en un nivel de aproximadamente 70% a aproximadamente 100% en comparación con el contenido inicial de α -trombina y/o que reduce el nivel de degradación de los polipéptidos a aproximadamente 0% a aproximadamente 30% en comparación con el nivel de polipéptidos de degradación en ausencia del compuesto de prueba. "Estabilizar la actividad de trombina" se refiere, por ejemplo, a la reducción de la actividad autolítica de la trombina. "Estabilizar la actividad de la trombina" también puede referirse al mantenimiento de la actividad de la trombina cuando se almacena durante más de un día, por ejemplo, a temperatura ambiente como una solución acuosa de trombina, por ejemplo, una solución concentrada de trombina; más de dos años a igual o menos de -18°C ; y/o más de un mes a $2-8^{\circ}\text{C}$, sin comprometer significativamente la actividad biológica de la trombina hacia sustratos heterólogos, incluida la actividad de conversión de fibrinógeno en fibrina. Se entiende que "temperatura ambiente" incluye una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C , o de 22°C a aproximadamente 25°C . "Actividad de trombina" significa que incluye la conversión mediada por trombina de sustratos heterólogos, incluyendo proteínas, por ejemplo, fibrinógeno en fibrina, también como la conversión del Factor VIII a Factor VIIIa, XI a XIa, XIII a XIIIa, y Factor V a Va. Un "sustrato heterólogo" es un sustrato, preferiblemente un sustrato de proteínas, distinto de la trombina. En algunas realizaciones, la actividad de trombina se refiere a la conversión de fibrinógeno en fibrina.

El término "estabilizar" significa, por ejemplo, mantener la actividad/potencia de la trombina dentro de la formulación líquida de trombina a un nivel de aproximadamente 70% a aproximadamente 100% (p. ej. aproximadamente 90 a 100%) en comparación con la actividad de trombina inicial.

En algunas realizaciones, el (los) compuesto(s) inhiben la autólisis de trombina en aproximadamente un 70% a aproximadamente 100%, aproximadamente 70% a aproximadamente 95%, aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, o aproximadamente 70% a aproximadamente 80%, y retiene aproximadamente 70% a aproximadamente 100%, aproximadamente 70% a aproximadamente 95%, aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, o aproximadamente 70% a aproximadamente 80% de actividad biológica de trombina.

El término "compuestos de prueba" o "sustancia de prueba" es un compuesto químicamente definido o mezcla de compuestos cuya capacidad para estabilizar la trombina se define por los métodos de la invención. Estos compuestos o mezclas de compuestos pueden ser cualquier excipiente(s)/estabilizadores conocidos en la técnica, tal como se describe en Dave A. Parkins y Ulla T. Lashmar "The formulation of biopharmaceutical products". PSTT vol. 3, N° 4 Abril de 2000.

El término "contenido inicial de α -trombina" se refiere, por ejemplo, a la actividad de la trombina hacia el fibrinógeno medida en una formulación líquida de trombina inmediatamente después de descongelar una formulación de trombina congelada; inmediatamente después de reconstituir la trombina en polvo; y/o antes del almacenamiento de trombina líquida en condiciones que permitan la autodegradación (por ejemplo, más de dos años de almacenamiento a igual o menos de -18°C ; más de un mes de almacenamiento a $2-8^{\circ}\text{C}$; y/o más de 1 día a temperatura ambiente) por ejemplo, a concentraciones de 800 UI/ml a 10.000 UI/ml de trombina o más).

En algunas realizaciones, el tiempo de incubación es más de un día (por ejemplo, a temperatura ambiente) como una solución acuosa de trombina, por ejemplo, una solución concentrada de trombina; más de dos años a igual o menos de -18°C ; y/o más de un mes a $2-8^{\circ}\text{C}$.

El término "polipéptidos de degradación" se refiere a polipéptido β -trombina y/o γ -trombina.

El término "superficie" puede referirse a una superficie externa de la piel que puede verse por visión sin ayuda y a una superficie de una parte interna del cuerpo que es parte de la anatomía interna de un organismo. Las superficies externas incluyen, entre otras, la piel de la cara, garganta, cuero cabelludo, pecho, espalda, orejas, cuello, mano, codo, cadera, rodilla y otros sitios de la piel. Los ejemplos de partes internas del cuerpo incluyen, pero no se limitan a,

cavidades corporales o aberturas anatómicas que están expuestas al ambiente externo y órganos internos como las fosas nasales; los labios; las orejas; el área genital, que incluye el útero, la vagina y los ovarios; los pulmones; el ano; el bazo; el hígado; y el músculo cardíaco. La superficie puede ser un sitio sangrante o no sangrante.

5 Las formulaciones y los kits descritos en este documento pueden usarse interna y externamente, para la fijación de injertos de tejidos y órganos, para sellar una herida quirúrgica, en cirugía vascular que incluye proporcionar hemostasia, para anti-adhesión y para anastomosis tales como anastomosis arterial, gastrointestinal y traqueal.

10 Un "sujeto" tal como se usa en el presente documento, incluye seres humanos y animales de origen mamífero. En una realización, un sujeto es un paciente de cirugía o un paciente herido. La α -trombina purificada y/o la β -trombina purificada pueden usarse en productos hemostáticos.

La α -trombina o la β -trombina se pueden usar en combinación con fibrinógeno para formar un sellador de fibrina.

15 El fibrinógeno se puede preparar a partir de la composición sanguínea inicial. La composición sanguínea puede ser sangre entera o fracciones de sangre, es decir, un producto de sangre completa como el plasma. En una realización de la invención, el componente de fibrinógeno está compuesto por un componente biológicamente activo (BAC) que es una solución de proteínas derivadas del plasma sanguíneo que puede comprender además ácido tranexámico y/o estabilizadores tales como arginina, lisina, sus sales farmacéuticamente aceptables o mezclas de las mismas. BAC
20 puede derivarse de crioprecipitado, en particular crioprecipitado concentrado.

25 El término "crioprecipitado" se refiere a un componente sanguíneo que se obtiene del plasma congelado preparado a partir de sangre completa. Se puede obtener un crioprecipitado cuando el plasma congelado se descongela en frío, típicamente a una temperatura de 0-4°C, lo que resulta en la formación de un precipitado que contiene fibrinógeno y Factor XIII. El precipitado puede recogerse, por ejemplo por centrifugación y disolverse en un tampón adecuado tal como un tampón que contiene cloruro de sodio 120 mM, citrato trisódico 10 mM, glicina 120 mM, hidrocloreto de arginina 95 mM. La solución de BAC puede comprender más factor VIII, fibronectina, factor von Willebrand (vWF), vitronectina, etc., por ejemplo, como se describe en US-B-6,121,232 y WO9833533. Preferiblemente, la composición de BAC puede comprender estabilizadores tales como ácido tranexámico y clorhidrato de arginina. Típicamente, la
30 cantidad de fibrinógeno en BAC está en el intervalo de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 mg/ml. La cantidad de ácido tranexámico en la solución de BAC puede ser de aproximadamente 80 a aproximadamente 110 mg/ml. La cantidad de hidrocloreto de arginina puede ser de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 mg/ml.

35 Opcionalmente, la solución se amortigua a un valor de pH fisiológicamente compatible. El tampón puede estar compuesto de glicina, citrato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de calcio y agua para inyección como vehículo. La glicina puede estar presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 mg/ml, el citrato de sodio puede estar en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/ml, el cloruro de sodio puede estar en el rango de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 mg/ml y cloruro de calcio pueden estar en la concentración de aproximadamente 0,1-0,2 mg/ml.

40 En otra realización, la concentración de plasminógeno y plasmina en la composición de BAC se reduce a igual o menos de 15 µg/ml como, por ejemplo, 5 µg/ml o menos plasminógeno usando un método como se describe en los documentos US-B-7,125,569, EP 1,390,485 y WO02095019. En otra realización de la invención, cuando se reduce la concentración de plasminógeno y plasmina en la composición de BAC, la composición no contiene ácido tranexámico ni aprotinina. La solución de fibrinógeno puede ser el componente BAC2 (de EVICEL®) o cualquier otra solución que
45 contenga fibrinógeno, como fibrinógeno recombinante purificado o crioprecipitado producido a partir de plasma humano. El fibrinógeno puede ser autólogo, humano, incluido plasma agrupado, o de fuente no humana. También es posible que el fibrinógeno se prepare por métodos recombinantes o se pueda modificar químicamente.

50 **EJEMPLOS**

Para todos los ejemplos, en este documento, se utilizan los siguientes términos:

55 Una "solución de trombina" se refiere a una solución de trombina a aproximadamente 3000 UI/ml de trombina, una concentración de proteína total de aproximadamente 1 mg/ml, en acetato de sodio 20 mM a pH 6,9-7,1.

Una "formulación de trombina" o "trombina formulada" se refiere a un producto farmacológico de trombina formulado EVITHROM® Thrombin, Topical (Humano) (ETHICON, Inc.) o el componente de trombina de EVICEL® Fibrin Sealant (ETHICON, Inc.), con una actividad de trombina en el intervalo de 800-1200 UI/ml, una concentración de proteína total
60 de aproximadamente 5,7-6,5 mg/ml, y 5,0 a 6,5 mg/ml de albúmina sérica humana (HSA) a pH 6,9-7,1. La HSA utilizada para la formulación de trombina incluye un estabilizador, acetiltriptófano.

65 En todos los experimentos a continuación, la solución de trombina se usó como una "muestra de control" que comprende polipéptidos de degradación de trombina ya que la trombina presente no está formulada (por ejemplo, no comprende estabilizadores) y está altamente concentrada (aproximadamente 3000 UI/ml) y, por lo tanto, la trombina es propensa a una degradación más rápida (en comparación con la trombina presente en la "formulación de trombina").

En los siguientes ejemplos, se evaluó la capacidad de las herramientas para proporcionar separación entre α -trombina, sus polipéptidos de degradación y, si está presente, HSA, y para cuantificar α -trombina y sus polipéptidos de degradación.

En general, "buena separación" se considera una "resolución de referencia" entre los picos. "Resolución de referencia" significa una separación eficiente de los analitos, en donde los picos detectados como representativos de la elución de los analitos no se superponen; es decir, la respuesta del detector vuelve al nivel de línea base entre los picos.

"Separación suficiente" - aparece una clara distinción entre los picos de elución, sin embargo, la respuesta del detector no regresa completamente al nivel de línea base entre los picos.

Se considera una separación insuficiente - cuando aparecen superposiciones de picos en el cromatograma.

A menos que se indique con valores, el nivel de resolución/separación se evaluó visualmente. Cuando los valores numéricos se enumeran en los ejemplos a continuación, la resolución (R_s), el grado en que una columna cromatográfica separa componentes entre sí, se define matemáticamente de la siguiente manera: la resolución es la diferencia entre los tiempos de retención de pico de un pico seleccionado y el pico que lo precede se multiplica por una constante de 1,18, luego se divide por la suma de los anchos de pico al 50% de la altura del pico.

Un nivel de resolución igual o superior a 2 se considera una "resolución de referencia" y, por lo tanto, muestra una buena separación y permite una buena cuantificación de los picos. Una resolución igual o superior a 1,5 (e inferior a 2) se considera "separación suficiente" que permite la separación y la cuantificación.

Con respecto a la eficacia del método cromatográfico, los términos "separación" y "resolución" se usan indistintamente.

Ejemplo 1: Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC) de HSA, solución de trombina y trombina formulada.

Un procedimiento estándar para separar proteínas y fragmentos de las mismas es el empleo de dispositivos de HPLC en modo de fase inversa. El principio básico del método RP-HPLC es un dispositivo, que consta de una bomba doble, una columna polar y un detector. Las proteínas se inyectan en el dispositivo y se retienen en la columna. Al aumentar la concentración de disolventes orgánicos, las proteínas y péptidos retenidos en la columna se liberan de la columna y eluyen en el detector, donde se recibe una respuesta basada en la cantidad de proteínas eluidas en el momento dado.

En el siguiente ejemplo, un RP-HPLC con una columna C4 (Phenomenex, Jupiter, 00G-4167-B0, 4,6 x 250 mm) se evaluó como una herramienta para separar entre la α -trombina, sus polipéptidos de degradación y, si está presente, HSA, y para cuantificar la α -trombina y sus polipéptidos de degradación.

El análisis de HPLC se realizó utilizando un módulo de separación de Waters Alliance, e2695 con un circuito de inyección de 100 μ L; se usó un detector de matriz de fotodiodos (PDA), 2998 (escaneo entre $A_{190\text{ nm}}$ a $A_{450\text{ nm}}$) con un horno de columna integral Waters a 50°C.

Los disolventes/soluciones orgánicas utilizados para la separación fueron:

Tampón A: agua de grado HPLC + ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% (v/v);

Tampón B: acetonitrilo + ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% (v/v).

Se evaluaron diferentes gradientes de solución (proporciones de tampón A y tampón B a lo largo del tiempo).

Las muestras inyectadas fueron: a) 30 μ L de solución de trombina; b) 100 μ L de trombina formulada; c) 100 μ L 5 mg/ml de HSA; y d) 100 μ L de agua de grado HPLC como muestra en blanco.

En todos los experimentos, los diferentes volúmenes de inyección se basaron en el hecho de que la trombina en la solución de trombina estaba más concentrada en comparación con la trombina formulada.

Antes de la inyección, todas las muestras se filtraron a través de un 0,45 μ m de membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore, para filtrar partículas más grandes, por ejemplo, agregados). Las muestras se almacenaron a 10°C en un compartimento de muestra integral hasta que se inyectaron en la HPLC.

La Fig. 1 muestra una vista ampliada de un cromatograma representativo en la región de los picos de elución.

En todas las Figs., las representaciones de muestra se muestran de arriba a abajo según el comienzo del cromatograma, la muestra inyectada (de arriba a abajo) aparece en el cromatograma. Las ejecuciones de las

diferentes muestras se muestran en una figura como superposiciones apiladas.

Aunque hubo separación entre los picos principales de HSA y trombina, en general no se logró una separación suficiente. Los picos eluidos de la columna estaban demasiado cerca para permitir una separación confiable y/o cuantificación de los picos.

Se llevaron a cabo experimentos adicionales en los que se alteraron las condiciones, incluida la temperatura, la química de la columna (a continuación se enumeran diferentes columnas RP probadas), la química de la fase móvil (como el metanol) y los gradientes, aunque la resolución entre α -trombina y sus polipéptidos de degradación y/u otras proteínas, por ejemplo, HSA, no mejoraron.

Se probaron las siguientes columnas RP adicionales: Cosmosil C4, 5 μ m, 300 A, 4,6 x 250 mm; Sepax BioC18, 3 μ m, 300 A, 4,6 x 150 mm; LiChroCART, 5 μ m, 300 A, 4 x 250 5 mm; Sepax C8, 5 μ m, 300 A, 4 x 250 mm; Waters XBridge C4, 3,5 μ m, 300 A, 4 x 250 mm para la separación y cuantificación como se mencionó anteriormente.

Por lo tanto, se concluyó que RP-HPLC no es una herramienta adecuada si se desea una "separación en columna" o "separación de una sola columna" y/o cuantificación de α -trombina en presencia de polipéptidos de degradación y/o HSA.

Ejemplo 2: Cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico (AEX-HPLC) y elución usando un gradiente de sal lineal y pH 8,0. (no dentro del alcance de la invención)

Un procedimiento estándar para separar proteínas y fragmentos de las mismas es el empleo de dispositivos HPLC en modo de intercambio aniónico. El principio básico del método AEX-HPLC es un dispositivo, que consta de una bomba doble, una columna polar y un detector. Las proteínas se inyectan en el dispositivo y se retienen en la columna. Al cambiar las características del disolvente (p. ej., concentración de sal, pH), las proteínas y péptidos retenidos en la columna se liberan de la columna y se eluyen en el detector, donde la respuesta se recibe en función de la cantidad de proteínas eluidas en el momento dado.

En este experimento, se evaluó el análisis por HPLC utilizando una columna de intercambio aniónico como una herramienta para separar entre α -trombina, sus polipéptidos de degradación y, si está presente, HSA y para cuantificar α -trombina y sus polipéptidos de degradación.

El análisis AEX-HPLC se realizó utilizando un módulo de separación de Waters Alliance, e2695 con un bucle de inyección de 100 μ L; se usó un detector PDA a A_{220 nm} y A_{280 nm}; y un horno de columna integral de Waters a 25°C. La columna utilizada fue un Sepax 403NP5-4625 (Sepax Proteomic SAX-NP5 NP 4,6 x 250 mm 403NP5-4625). La columna (4,6 mm de ancho y 250 mm de largo) se basa en perlas de polímero de 5 μ m. Las perlas tienen química de amonio cuaternario y son partículas no porosas mono dispersas.

Para elución del AEX-HPLC, se usaron un gradiente de sal lineal entre el tampón A: 20 mM Tris pH 8,0 en agua de grado HPLC; y tampón B: 20 mM Tris pH 8,0 y 1 M NaCl en agua de grado HPLC.

Las muestras inyectadas fueron: a) 30 μ L de solución de trombina; b) 100 μ L de trombina formulada; c) 100 μ L 5 mg/ml de HSA; y d) 100 μ L de tampón A como muestra en blanco.

Antes de la inyección, todas las muestras se filtraron a través de un filtro de jeringa de 4 mm con una membrana de PVDF de tamaño de poro de 0,45 μ m. Las muestras se almacenaron a 10°C en un compartimento de muestra integral hasta que se inyectaron en la HPLC. El tiempo de ejecución fue de 37 minutos; el caudal utilizado fue de 0,8 ml/min y la presión fue de aproximadamente 2600 psi.

La Fig. 2 muestra una vista ampliada de un cromatograma representativo en la región de los picos de elución.

Los resultados muestran que AEX-HPLC con tampón de elución a pH 8,0 y gradiente de sal lineal a 1 M NaCl no proporcionó suficiente separación y/o no permitió una cuantificación confiable. Los picos eluidos de la columna estaban demasiado cerca uno del otro, la resolución no era suficiente.

Ejemplo 3: AEX-HPLC y elución usando un gradiente de sal lineal y pH 6,0. (no dentro del alcance de la invención)

El ejemplo anterior mostró que a pH 8,0 y un gradiente de sal lineal, fue limitada la separación entre α -trombina, sus polipéptidos de degradación y HSA.

En este ejemplo, se evaluó la elución usando un tampón fosfato a pH 6,0 con un gradiente creciente a 1 M NaCl usando la columna, el dispositivo y la configuración experimental como se describe en el ejemplo 2.

Para la elución del AEX-HPLC, un gradiente de sal lineal entre el tampón A: tampón fosfato 20 mM a pH 6,0 en agua de grado HPLC; y tampón B: se usaron tampón fosfato 20 mM pH 6,0 y 1 M NaCl en agua de grado HPLC.

Las muestras inyectadas fueron: a) 30 µL de solución de trombina; b) 100 µL de trombina formulada; c) 100 µL 5 mg/ml de HSA; y d) 100 µL de tampón A como muestra en blanco.

5 La Fig. 3 muestra un cromatograma representativo obtenido para las diferentes muestras.

Los resultados muestran que AEX-HPLC con tampón de elución pH 6,0 y gradiente de sal a 1 M NaCl no proporcionó suficiente separación y/o no permitió una cuantificación confiable. El acetiltriptófano visto en el cromatograma es un estabilizador presente en la formulación de HSA.

10 **Ejemplo 4: AEX-HPLC y elución usando un gradiente de sal lineal y pH 7,5.** (no dentro del alcance de la invención)

Los ejemplos anteriores mostraron que la separación estaba limitada usando un tampón de elución a pH 6,0 (Ejemplo 3) y 8,0 (Ejemplo 2), y por lo tanto fue probado un tampón de elución a pH 7,5.

15 El análisis y las condiciones de HPLC se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2. La elución se realizó usando un tampón Tris a pH 7,5 con un gradiente lineal creciente de NaCl. Los tampones utilizados fueron: Tampón A: Tris 20 mM a pH 7,5 en agua de calidad HPLC; y tampón B: Tris 20 mM, pH 7,5 y 1 M NaCl.

20 Las muestras inyectadas fueron: a) 30 µl de solución de trombina; b) 100 µl de trombina formulada; c) 100 µl 5 mg/ml de HSA; y d) 100 µl de tampón A como muestra en blanco. Los resultados se muestran en la Fig. 4 (vista ampliada). Los resultados muestran que AEX-HPLC con tampón de elución pH 7,5 y gradiente de sal a 1 M NaCl no proporcionó suficiente separación y/o no permitió una cuantificación confiable.

25 **Ejemplo 5: AEX-HPLC y elución usando un gradiente de sal lineal NaNO₃ y pH 8,0.** (no dentro del alcance de la invención)

Como alternativa a NaCl, se evaluó la capacidad de NaNO₃ (nitrato de sodio) para separar el polipéptido de degradación de trombina de la α-trombina y de las proteínas restantes en solución, por ejemplo, HSA.

30 Se evaluó un gradiente de sal lineal entre el tampón A: Tris 20 mM a pH 8,0 en agua de grado HPLC; y tampón B: Tris 20 mM a pH 8,0/1 M NaNO₃. La columna, el dispositivo y la configuración experimental fueron como se describe en el Ejemplo 2.

35 Las muestras inyectadas fueron: a) 30 µL de solución de trombina; b) 100 µL de trombina formulado y c) 100 µL 5 mg/ml de HSA. Los resultados se muestran en la Fig. 5. Como se mencionó anteriormente, la solución de trombina contenía polipéptidos de degradación.

40 Los resultados muestran que el uso de NaNO₃ como eluyente aumentó considerablemente la separación entre HSA, acetiltriptófano y trombina, sin embargo, no se logró una resolución suficiente entre la trombina y sus polipéptidos de degradación.

Ejemplo 6: AEX-HPLC y elución usando un gradiente lineal entre pH 9,1 y pH 3,4.

45 Como alternativa al uso de un gradiente de sal para lograr la separación entre los picos relevantes eluidos de la resina AEX-HPLC, se evaluó un gradiente de pH usando tampones a base de amina. Debido al carácter amina del tampón, la detección se realizó a A_{280nm}.

50 Los tampones A y B contenían: piperazina 20 mM (Sigma Aldrich, P45907), trietanolamina 20 mM (Sigma Aldrich, T9534), bis-tris propano 20 mM (Sigma Aldrich, B4679) y 1-metilpiperazina 20 mM (Sigma Aldrich, 13000-1).

55 Los tampones se ajustaron a pH 9,1 (tampón A) y pH 3,4 (tampón B) mediante valoración con HCl. El tiempo total de ejecución fue de 46 minutos. En todos los experimentos, se ejecutó un gradiente lineal entre los pasos 2 y 3 (consulte la Tabla 1 a continuación) - el tiempo de ejecución para el gradiente lineal fue de 20 minutos. Durante los pasos 2 y 3, los materiales se eluyen de la columna.

Las muestras inyectadas fueron: a) 30 µl de solución de trombina; b) 100 µl de trombina formulada; c) 100 µl 5 mg/ml de HSA; y d) 100 µl de tampón A como muestra en blanco.

60 Las condiciones de flujo y la relación entre los tampones se presentan en la Tabla 1. El pH del tampón de elución depende de la relación entre el tampón A y el B. En general, una ejecución típica de HPLC consta al menos de los siguientes pasos:

Se carga una columna equilibrada con el material (tiempo entre los pasos 1 y 2 - "Cargando").

65 Después de este paso, el material se eluye de la columna (entre los pasos 2 y 3 - "Gradiente lineal"). Esto puede

llevarse a cabo isocráticamente (sin cambiar la composición del tampón en comparación con los pasos de carga y/o equilibrio) o mediante gradiente (cambiando una de las características del tampón, por ejemplo, concentración de sal, polaridad/pH). En este ejemplo, la elución se realizó usando un gradiente lineal.

- 5 En el siguiente paso, la columna se puede regenerar (entre los pasos 3 y 4 - "Regeneración de la columna"), lo que significa que los materiales restantes reciben tiempo adicional a la concentración más alta de la característica modificada (concentración de sal, polaridad, pH) en orden para eluir de la columna cualquier material restante.

10 El último paso (entre los pasos 5 y 6 - "Equilibrio de columna") es un paso de equilibrio, para permitir que la columna regrese al estado original en donde la columna es adecuada para una separación adicional.

Las condiciones, la columna y el dispositivo fueron como se describe en el Ejemplo 2.

Tabla 1: Gradiente y condiciones de flujo.

Paso	Tiempo (min)	Velocidad de flujo (mL/min)	% tampón A	% tampón B
1	0,01	0,80	90,0	10,0
2	5,00	0,80	90,0	10,0
3	25,00	0,80	0,0	100,0
4	30,00	0,80	0,0	100,0
5	31,00	0,80	90,0	10,0
6	46,00	0,80	90,0	10,0
- Entre los pasos 1 y 2 - Carga - 5 minutos. - Entre los pasos 2 y 3 - Gradiente lineal - 20 minutos. El incremento del tampón B fue del 4,5% por minuto. - Entre los pasos 3 y 4 - "Regeneración de columna" - 5 minutos. - Entre los pasos 5 y 6 - "Equilibrio de columna" - 15 minutos.				

En todas las tablas a continuación, los pasos se caracterizan y numeran de la misma manera.

35 La Fig. 6 muestra cromatogramas representativos de las muestras inyectadas. La Fig. 7 es una vista ampliada de la región de elución de trombina en el cromatograma de la Fig. 6.

Los resultados muestran que se obtuvo una buena resolución entre HSA, acetiltriptófano y trombina. En las condiciones descritas, se obtuvieron varios picos de trombina (se muestra mejor en la Fig. 6). En los siguientes ejemplos, se examinaron parámetros adicionales para mejorar aún más la resolución de los picos de trombina.

Ejemplo 7: AEX-HPLC y elución usando un gradiente de pH lineal a diferentes velocidades de flujo.

45 Para obtener una mejor separación entre los diferentes picos de trombina, se evaluaron diferentes velocidades de flujo manteniendo la temperatura (a 25°C como en los Ejemplos 2-7) y el gradiente de pH constante.

Los tampones A y B fueron los mismos que en el Ejemplo 6. El programa (véase la Tabla 2 a continuación) se ejecutó cuatro veces. Cada vez a una velocidad de flujo diferente: 0,25, 0,5, 0,75 y 1 ml/min.

50 Los gradientes evaluados son los que se muestran en la Tabla 2 a continuación.

La muestra inyectada fue 30 µl de solución de trombina para cada velocidad de flujo probada.

Tabla 2: Gradiente y condiciones de flujo.

Paso	Tiempo (min)	% Tampón A	% Tampón B
1	0,01	90,0	10,0
2	5,00	90,0	10,0
3	25,00	0,0	100,0
4	30,00	0,0	100,0
5	31,00	90,0	10,0
6	46,00	90,0	10,0

La Fig. 8 muestra una vista ampliada de los cromatogramas de la pantalla de flujo realizada.

La separación (inspeccionada visualmente) entre HSA, acetiltriptófano y trombina no se vio afectada por el aumento en la velocidad de flujo (datos no mostrados).

Se mostró (Fig. 8) que la resolución entre la α -trombina y sus polipéptidos de degradación aumenta al aumentar las velocidades de flujo. La mejor resolución se logró a una velocidad de flujo de 1,0 mL/min, por ejemplo, se observan más picos.

Ejemplo 8: AEX-HPLC y elución usando un gradiente de pH del 100% de tampón A.

En este ejemplo, se evaluó el efecto de iniciar el método AEX-HPLC a un pH más alto, en comparación con los ejemplos anteriores, sobre la resolución de separación. Para este propósito, se usó un gradiente de pH con 100% de Tampón A (ver Tabla 3) en lugar de 90% (como se usa en la Tabla 2). Como control, el mismo conjunto de muestras se procesó de la manera descrita en la Tabla 3, pero en los pasos 1, 2, 5 y 6 el porcentaje de Tampón A fue de 90 y el porcentaje de tampón B fue de 10.

Los tampones A y B fueron los mismos que en el Ejemplo 6. A menos que se escriba lo contrario, la configuración experimental fue la misma que en el Ejemplo 6.

La resolución entre los picos se evaluó visualmente. La Tabla 3 muestra las condiciones de gradiente y velocidad de flujo.

Tabla 3: Gradiente y condiciones de flujo.

Paso	Tiempo de ejecución (min)	Flujo (mL/min)	% Tampón A	% Tampón B
1	0,01	1,00	100,0	0,0
2	5,00	1,00	100,0	0,0
3	27,00	1,00	0,0	100,0
4	32,00	1,00	0,0	100,0
5	33,00	1,00	100,0	0,0
6	48,00	1,00	100,0	0,0
-El aumento del Tampón B era 4,55% por minuto.				

Los resultados (datos no mostrados) mostraron que comenzar el gradiente a un pH más alto produjo una mejor resolución para los picos de trombina. En consecuencia, eluir las proteínas de la columna con un rango de pH más amplio dará como resultado una mejor separación entre los picos.

En los siguientes ejemplos se usó un gradiente de pH con 100% de tampón A.

Ejemplo 9: AEX-HPLC y elución usando un gradiente de pH lineal en tiempos de ejecución gradiente crecientes.

Para obtener una mejor separación/resolución entre los diferentes picos de trombina, se evaluaron los gradientes crecientes (es decir, el aumento de tiempo entre los pasos 2 y 3), cada uno de cinco minutos a 51, 56 y 61 minutos de tiempo de ejecución total, en comparación con el tiempo de ejecución en el Ejemplo 6 (es decir, el tiempo entre los pasos 2 y 3 aumentó de 20 a 25, 30 y 35 minutos). También se probó un tiempo de ejecución de 46 minutos (como en el Ejemplo 6). La resolución se midió entre cada pico a su pico anterior.

A menos que se indique lo contrario, la configuración experimental fue la misma que en el Ejemplo 8 usando los parámetros enumerados en la Tabla 3.

Se inyectó una solución de trombina (30 μ L). Los tampones A y B son los mismos que en el Ejemplo 6. Las tablas 4, 5, 6 y 7 muestran el tiempo de retención y la resolución alcanzada en un tiempo de ejecución total de 46, 51, 56 y 61 minutos, respectivamente. El tiempo de retención es el intervalo entre el instante de inyección y la detección del ápice máximo (el punto más alto del pico) como representante de la elución.

Tabla 4: La resolución de los picos de trombina a los 46 minutos de tiempo total de ejecución.

Número de pico	Tiempo de retención de los picos (min)	Resolución
1	13,091	
2	14,525	3,009959
3	15,736	2,475773
4	17,171	3,529876
5	18,173	3,279746
6	19,055	3,217816
7	20,337	5,087464

Tabla 5: La resolución de los picos de trombina a 51 minutos de tiempo de ejecución total.

Número de pico	Tiempo de retención de los picos (min)	Resolución
1	12,514	
2	14,313	3,293685
3	15,852	2,902742
4	17,598	4,012924
5	18,852	3,893394
6	19,990	2,642576
7	21,557	5,218836e

Tabla 6: La resolución de los picos de trombina a los 56 minutos de tiempo de ejecución total.

Número de pico	Tiempo de retención de los picos (min)	Resolución
1	13,018	
2	15,130	3,116849
3	16,980	2,923051
4	18,025	1,818590
5	19,050	2,188510
6	20,549	4,065546
7	21,929	3,775590
8	23,792	5,461505

Tabla 7: La resolución de los picos de trombina a los 61 minutos de tiempo de ejecución total.

Número de pico	Tiempo de retención de los picos (min)	Resolución
1	10,682	
2	13,480	5,056362
3	15,912	3,370500
4	18,064	3,068171
5	19,292	1,846318
6	20,453	2,142551
7	22,197	4,254319
8	23,824	3,981067

Los resultados muestran que a 56 y 61 minutos de tiempo de ejecución total (una longitud de gradiente de 30 y 35 minutos), un pico adicional eluyendo en una región distinta a los picos de trombina se separó en comparación con los tiempos de ejecución más cortos.

Ventajosamente, para obtener un pico adicional eluyendo en la región de trombina distinta, se puede usar una longitud de gradiente superior a 25 minutos.

En los siguientes ejemplos, se utilizó un tiempo de ejecución total de 56 minutos.

Ejemplo 10: El efecto de la pendiente del gradiente lineal en la resolución de separación.

Se evaluaron diferentes gradientes de pendiente lineal por su capacidad para mejorar la separación de los picos de trombina (gradientes utilizados entre los pasos 2 y 3). La pendiente se ve afectada por el incremento del porcentaje de tampón B por minuto. Un aumento menor del porcentaje de tampón B por minuto da como resultado una pendiente más superficial en comparación con un aumento mayor del porcentaje de tampón B por minuto, lo que afecta el perfil

de elución de las proteínas. Al contrario del Ejemplo 8 en donde el gradiente se vio afectado usando un pH inicial diferente, en este Ejemplo, el gradiente se vio afectado incrementando el valor del pH a diferentes velocidades por minuto (el pH del inicio y el punto final son iguales en todas las muestras).

- 5 Los tampones A y B fueron los mismos que en el Ejemplo 6. A menos que se indique lo contrario, la configuración experimental fue la misma que en el Ejemplo 6. Se inyectó una solución de trombina (30 μ l). El tampón A (30 μ l) se usó como blanco (no mostrado).

10 El aumento de porcentajes de tampón B por minuto evaluado fue: 4,5%, 4,25%, 4%, 3,75% y 3,5%. Por ejemplo, cuando se usó un porcentaje de 4,5% por minuto, después del primer minuto se obtuvo 4,5% de tampón B por minuto, después del segundo minuto se obtuvo 9% de tampón B por minuto, después del tercer minuto se obtuvo 13,5% de tampón B por minuto, etc., hasta 100% de tampón B por minuto. En cada minuto se usó el tampón A para completar la solución total al 100%.

- 15 Por lo general, una pendiente menos profunda da como resultado un mayor tiempo de ejecución. Los tiempos de ejecución fueron los siguientes: 48, 49,5, 51, 52,7 y 54,6 minutos, respectivamente al porcentaje de tampón B listado.

20 La Fig. 9 muestra el cromatograma obtenido para los diferentes gradientes evaluados, se realizó una inspección visual para determinar la resolución de separación.

Los resultados muestran que todas las pendientes probadas mostraron una separación satisfactoria/suficiente entre los picos de trombina con un incremento del 3,5% con la mejor separación (visto en la vista ampliada, datos no mostrados).

25 **Ejemplo 11: Identificación de los diferentes picos de trombina mediante inyección de estándares comerciales en AEX-HPLC.**

Para identificar los picos de trombina en el cromatograma, se ejecutó una solución de trombina como en el Ejemplo 7 además de los estándares de trombina α , β e γ utilizando una velocidad de flujo de 1,0 mL/min.

30 Los estándares (Haematological Industries; α -trombina humana, HTI HCT-0020, β -trombina humana, HTI-0022, γ -trombina humana, HTI-0021) se diluyeron a 0,3 mg/ml antes de la inyección. Se inyectaron 30 μ l de solución de trombina, 100 μ l de cada estándar α , β y γ en la HPLC. El tampón A se utilizó como blanco.

- 35 Los tampones A y B fueron los mismos que se describen en el Ejemplo 7 y se usaron en el programa que se muestra en la Tabla 2.

40 La Fig. 10 muestra los cromatogramas superpuestos. Sobre la base de los picos obtenidos para los estándares, fue posible identificar los picos de correlación de la solución de trombina γ , de este modo, verificar que se puede lograr la separación entre la α -trombina y sus polipéptidos de degradación trombina β y γ . Además, se observó que la trombina eluye como picos múltiples en el cromatograma.

Ejemplo 12: Identificación de picos de trombina utilizando transferencia Western como herramienta cualitativa.

- 45 En el ejemplo anterior, la identificación de los picos de trombina se llevó a cabo mediante inyección de estándares comerciales de trombina α , β e γ en AEX-HPLC.

50 Para corroborar los resultados anteriores, en este ejemplo se recogieron picos de trombina de una solución de trombina inyectada y se identificaron adicionalmente cualitativamente por transferencia Western contra estándares comerciales (como en el Ejemplo 11) basada en el tamaño conocido de trombina y sus polipéptidos de degradación, β - y γ -trombina.

55 Para obtener cantidades suficientes de β - y γ -trombina, se incubó una solución de trombina en condiciones que mejoran la autodegradación de la trombina, como durante la noche durante al menos 12 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 20-25°C) antes de la inyección en la HPLC. La configuración experimental fue como en el Ejemplo 10, se usó el aumento de 3,5% de B/min. Se inyectaron 60 μ l de la muestra (en tetraplicatos) y 100 μ l de tampón A.

60 Los picos distintos (mostrados e identificados en la Fig. 11 y la Tabla 8) se recogieron de las cuatro ejecuciones separadas (debido a la pequeña cantidad de proteína presente en cada pico), se agruparon (según la identificación visual y el tiempo de retención) y se liofilizaron debido al gran volumen de recogida. Cada pico agrupado liofilizado se reconstituyó (en un volumen menor de agua en comparación con el volumen inicial debido a las limitaciones en el posible volumen de carga de la SDS-PAGE). Las muestras agrupadas resultantes se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a una hoja de nitrocelulosa y se inmunotransfuntaron contra la anti- α -trombina policlonal (datos no mostrados). Se usó una mezcla de α , β , γ como control.

- 65 Los picos se identificaron en función de los pesos moleculares de las bandas obtenidas en la transferencia Western y en comparación con la mezcla estándar α , β , γ .

Tabla 8: Picos recogidos después de la inyección de una solución de trombina.

Nº de pico	Tiempo de retención del pico (min)	Identificación
1	15,80 a 16,51	α -trombina
2	17,30 a 18,20	α -trombina
3	18,55 a 19,00	β -trombina
4	19,00 a 19,50	α -trombina
5	20,00 a 20,53	β - e γ -trombina
5a	20,53 a 20,7	β - e γ -trombina
6	21,00 a 21,22	α -trombina
7	21,9	no identificado
8	22,20 a 22,40	α -trombina
9		no identificado
10		no identificado

Los resultados obtenidos en la transferencia Western muestran que los polipéptidos de degradación de trombina eluyen en los picos 3, 5 y 5a. Los picos 1, 2, 4, 6 y 8 con un peso molecular similar se identificaron como α -trombina. El área relativa de los picos etiquetados como "no identificados" fueron pequeños en comparación con los picos "identificados".

Sin estar limitado por el mecanismo, la α -trombina se separa en varios picos en el sistema HPLC-AEX y probablemente corresponde a varias especies de α -trombina que difieren en su carga neta.

Los resultados de los ejemplos 11 y 12 muestran que se puede obtener ventajosamente una separación completa entre α , β , γ -trombina, especie de α -trombina y HSA (los datos de separación de HSA no se muestran en este ejemplo) usando un gradiente de pH lineal AEX-HPLC entre 100% de tampón A a 100% de tampón B con una pendiente de 3,5% de tampón B por minuto. Las composiciones de tampón son como se describe en el Ejemplo 6.

Ejemplo 13: Identificación de especies de α -trombina resueltas por HPLC-AEX.

El objetivo del presente Ejemplo fue caracterizar los picos múltiples detectados para la α -trombina en la cromatografía HPLC-AEX. Se exploró si las diferentes especies de α -trombina se deben a diferentes formas de α -trombina modificada post traducidas. Hay varias modificaciones posteriores a la traducción; la glicosilación es una posibilidad. Dado que la glicosilación afecta la actividad de las proteínas (Ricardo J. Sola y Kai Griebenow. "Glycosylation of Therapeutic Proteins: An Effective Strategy to Optimize Efficacy". BioDrugs. 2010; 24 (1): 9-21), el siguiente ejemplo se centra en la glicosilación.

La α -trombina humana tiene un único sitio de glicosilación unido a N en su "cadena pesada". Se exploró la posibilidad de que la α -trombina se resolviera en la cromatografía HPLC-AEX corresponden a α -trombina que contiene diferentes niveles de sialilación en el sitio de glicosilación unido, es decir, cantidades variables de ácido N-acetilneuramínico (NANA) (ácido siálico) en el sitio de glicosilación.

Para este propósito, una solución de trombina se sometió a tratamiento con N-acetilneuraminidasa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma Aldrich, N2876). La acetilneuraminidasa (NANasa) es una enzima capaz de eliminar los residuos de NANA del extremo terminal de los glicanos. Al eliminar estos residuos de azúcar cargados, la carga general de cada una de las proteínas glicosiladas se lleva al mismo nivel.

En el siguiente paso, la solución de trombina tratada con NANasa se inyectó en un sistema AEX-HPLC como se describe en el Ejemplo 12. La solución de trombina sin tratamiento se inyectó como control.

Los resultados (Fig. 12) muestran que el tratamiento de la trombina con NANasa afecta el perfil de elución, lo que resulta en un desplazamiento general de los picos hacia el lado izquierdo del cromatograma (en comparación con la solución de trombina no tratada). Debido a la pérdida de la carga negativa del residuo de ácido siálico, la carga neta de proteína de la trombina a un pH dado aumenta, causando así una elución más temprana de la columna. En vista de estos resultados, se puede concluir que los numerosos picos resultan de diferencias en el contenido de NANA.

Ejemplo 14: Purificación de α -trombina homogéneamente modificada postraduccionalmente a partir de una solución proteínica.

En los ejemplos anteriores se encontró que la α -trombina se puede resolver en picos distintos que contienen diferentes cantidades de nivel de NANA/sialilación.

En este ejemplo, el propósito era aislar una especie homogénea de α -trombina que contenía un perfil de NANA sustancialmente idéntico usando AEX-HPLC. Se utilizaron las siguientes condiciones:

- 5 La columna utilizada fue un Sepax 403NP5-4625, ancho: 4,6 x largo: 250 mm como en el Ejemplo 2. Fueron inyectados 30 μ l de solución de trombina, 100 μ l de trombina formulada y 100 μ l de tampón A (no mostrado).

10 La elución de las proteínas de la resina se llevó a cabo utilizando un gradiente de pH compuesto de piperazina 20 mM (Sigma Aldrich, P45907), trietanolamina 20 mM (Sigma Aldrich, T9534), 20 mM de bis-tris propano (Sigma Aldrich, B4679) y 1-metilpiperazina 20 mM (Sigma Aldrich, 13000-1). Los tampones se ajustaron a pH 9,1 (tampón A) y pH 3,4 (tampón B).

Se usó un gradiente de pH lineal, con un incremento de 3,5% de tampón B por minuto, y las condiciones de flujo como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9: Gradiente y condiciones de flujo.

Paso	Tiempo de ejecución (min)	Flujo (mL/min)	% tampón A	% tampón B
1	0,01	1,00	100,0	0,0
2	5,00	1,00	100,0	0,0
3	33,60	1,00	0,0	100,0
4	38,60	1,00	0,0	100,0
5	39,60	1,00	100,0	0,0
6	54,60	1,00	100,0	0,0

La Fig. 13 muestra el cromatograma de longitud completa de las dos muestras de trombina eluidas. La Fig. 14 muestra una vista ampliada de las especies de α -trombina y la región de elución de los polipéptidos de degradación.

- 30 Para el cromatograma de trombina formulado se puede ver que se puede lograr la separación completa entre HSA, varias especies de α -trombina cargadas (mostradas con flechas) y acetiltriptófano.

Para el cromatograma de solución de trombina se puede ver que se puede conseguir la separación completa entre varias especies de α -trombina cargadas (mostradas con flechas) y los polipéptidos de degradación.

35 Estos resultados muestran que diferentes especies homogéneas de α -trombina pueden separarse entre sí en una muestra que contiene trombina. Además, los resultados muestran que la calidad de la separación permite purificar homogéneamente α -trombina modificada postraduccionamente de una solución proteínica y/o una solución que comprende una trombina modificada heterogéneamente postraduccionamente.

40 **Ejemplo 15: Cuantificación de polipéptidos de degradación de α -trombina y trombina modificados postraduccionamente de forma homogénea.**

45 Los ejemplos anteriores muestran que los picos de α -trombina que contienen contenido homogéneo de NANA pueden estar bien separados por el AEX-HPLC. La separación completa de los picos permite la cuantificación de las variantes de trombina α , β , y en una solución que contiene trombina calculando la integración de un pico separado relevante - ver tabla 10. Las condiciones utilizadas en el AEX-HPLC fueron las descritas en el Ejemplo anterior.

Tabla 10: Cuantificación de las diferentes variantes de trombina.

Identificación	Tiempo de retención del pico (min)	Área*	Área (%)**
α -trombina	16,062	219077	6,72
α -trombina	17,698	2303906	70,65
β -trombina	18,717	119346	3,66
α -trombina	19,230	273402	8,38
β - e γ -trombina	20,146	177410	5,44
α -trombina	21,000	62339	1,91
no identificado	21,543	5349	0,16
α -trombina	22,157	87076	2,67
no identificado	24,008	8456	0,26
no identificado	24,939	4556	0,14

(continuado)

*Área se refiere al área integrada bajo el pico calculado por el software.
** El área relativa del área de pico total calculada.

5

Se demostró que se obtuvo la cuantificación de todas las especies de α -trombina y del polipéptido de degradación.

10

El método también puede usarse ventajosamente para cuantificar la cantidad de α -trombina de todas las proteínas presentes en la solución y/o para la detección de la formulación adecuada. Además, los resultados muestran que un tipo de β -trombina puede purificarse y cuantificarse usando el método de la invención.

15

Los títulos de las secciones se usan en este documento para facilitar la comprensión de la especificación y no deben interpretarse como necesariamente limitantes.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método cromatográfico de un solo paso para cuantificar α -trombina en una solución que comprende la α -trombina y al menos uno de un polipéptido de degradación de α -trombina u otra proteína, comprendiendo el método los pasos de:
 - poner en contacto la solución con un intercambiador de aniones;
 - separar la α -trombina del al menos uno de los polipéptidos de degradación de α -trombina y/o la otra proteína en la cromatografía de intercambio aniónico mediante condiciones de elución diferencial; y cuantificar la α -trombina.
 - en donde las condiciones de elución diferencial comprenden un gradiente de pH.
2. El método de la reivindicación 1, cuantificando adicionalmente uno o más polipéptidos de degradación.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la α -trombina separada es una α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente, cuantificando de este modo la α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente; opcionalmente en donde la α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente es una α -trombina homogénea glicosilada, cuantificando con ello la α -trombina homogénea glicosilada; opcionalmente en donde la α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente separada es una α -trombina homogénea sialada, cuantificando con ello la α -trombina homogénea sialada.
4. El método de la reivindicación 1, en donde la α -trombina es α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente y en donde otra proteína es α -trombina heterogénea modificada postraduccionalmente.
5. El método de la reivindicación 4, en donde la solución comprende además al menos uno de un polipéptido de degradación de α -trombina u otra proteína, y el método incluye la separación de α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente también de al menos uno del polipéptido de degradación de α -trombina y/o la otra proteína.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el método es un método de cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio de aniones.
7. Un método para purificar α -trombina de una solución que comprende la α -trombina y al menos uno de un polipéptido de degradación de α -trombina u otra proteína, comprendiendo el método los pasos de:
 - poner en contacto la solución con un intercambiador de aniones;
 - separar la α -trombina del al menos uno de los polipéptidos de degradación de α -trombina y/o la otra proteína por cromatografía de intercambio aniónico usando condiciones de elución diferencial; y
 - recolectar una fracción de α -trombina, obteniendo así α -trombina purificada;
 - en donde las condiciones de elución diferencial comprenden un gradiente de pH.
8. El método de la reivindicación 7, en donde la α -trombina es de una fuente de sangre o plasma humano.
9. El método de la reivindicación 7 u 8, en donde la fracción de α -trombina recogida es una α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente, obteniendo de ese modo una α -trombina homogénea modificada postraduccionalmente modificada; opcionalmente en donde la α -trombina modificada postraduccionalmente homogénea recogida es una α -trombina glicosilada homogénea, obteniendo de ese modo una α -trombina glicosilada homogénea purificada; opcionalmente en donde la α -trombina modificada postraduccionalmente homogénea recogida es una α -trombina sialilada homogénea, obteniendo así una α -trombina sialilada homogénea purificada.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el método consiste en una etapa de cromatografía.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7 a 10, en donde la solución comprende la otra proteína, y en donde la otra proteína es la albúmina sérica humana.
12. El método de la reivindicación 7, en donde la α -trombina es una glicoforma de α -trombina homogénea y en donde la otra proteína es una especie de α -trombina glicosilada heterogénea.
13. El método de la reivindicación 12, que comprende además cuantificar la glicoforma de α -trombina homogénea purificada.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el gradiente de pH se genera usando un eluyente que comprende una amina o una mezcla de aminas.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el intercambiador de aniones está hecho de partículas no porosas.

16. Un método cromatográfico de un paso para cuantificar β -trombina en una solución que comprende la β -trombina y al menos una de α -trombina, γ -trombina u otra proteína, comprendiendo el método los pasos de:

5 poner en contacto la solución con un intercambiador de aniones;
separar la β -trombina de la al menos una de la α -trombina, γ -trombina y/u otra proteína en cromatografía de intercambio aniónico por condiciones de elución diferencial; y cuantificar la β -trombina;
en donde las condiciones de elución diferencial comprenden un gradiente de pH.

10 **17.** Un método para purificar β -trombina de una solución que comprende la β -trombina y al menos una de α -trombina, γ -trombina u otra proteína, comprendiendo el método los pasos de:

 poner en contacto la solución con un intercambiador de aniones;
separar la β -trombina de al menos una de la α -trombina, γ -trombina y/u otra proteína por cromatografía de
15 intercambio aniónico usando condiciones de elución diferencial; y
recoger una fracción de β -trombina,
obteniendo así β -trombina purificada;
en donde las condiciones de elución diferencial comprenden un gradiente de pH.

20 **18.** Un método para seleccionar compuestos para su uso potencial en la estabilización de la actividad de trombina en una formulación acuosa de trombina líquida, comprendiendo el método los pasos de:

incubar compuestos de prueba con una solución que comprende α -trombina durante un tiempo dado; después de la incubación, cuantificar la α -trombina y/o los polipéptidos de degradación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; e identificar uno o más compuestos de prueba adecuados que tienen un uso potencial en la
25 estabilización de la actividad de la trombina, en donde un compuesto adecuado es un compuesto que mantiene el contenido de α -trombina en un nivel de aproximadamente 70% a aproximadamente 100% en comparación con la α -trombina inicial contenida y/o que reduce el nivel de degradación de polipéptidos a aproximadamente 0% a aproximadamente 30% en comparación con el nivel de degradación de polipéptidos en ausencia de los compuestos de prueba.
30

35

40

45

50

55

60

65

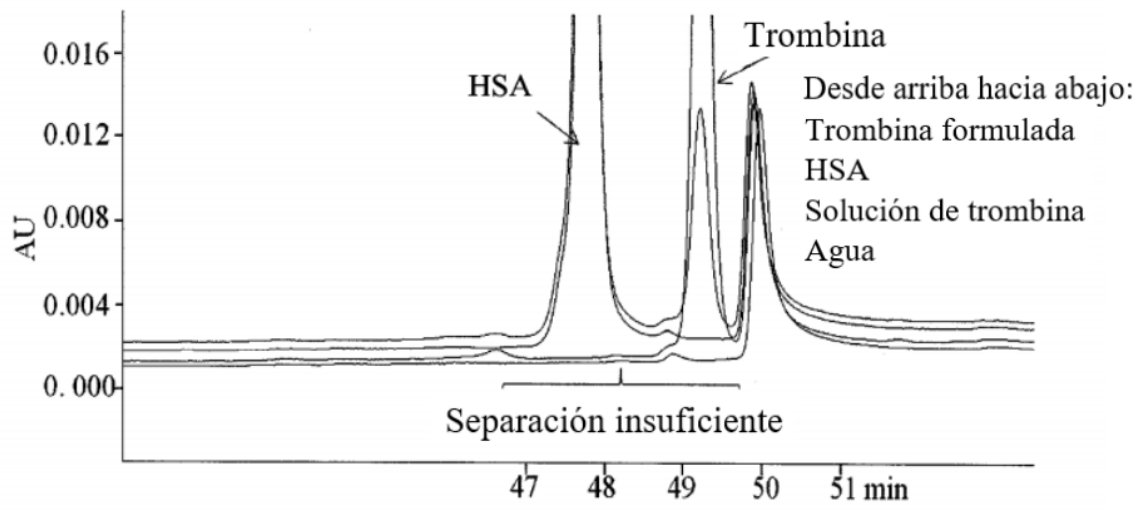


FIGURA 1

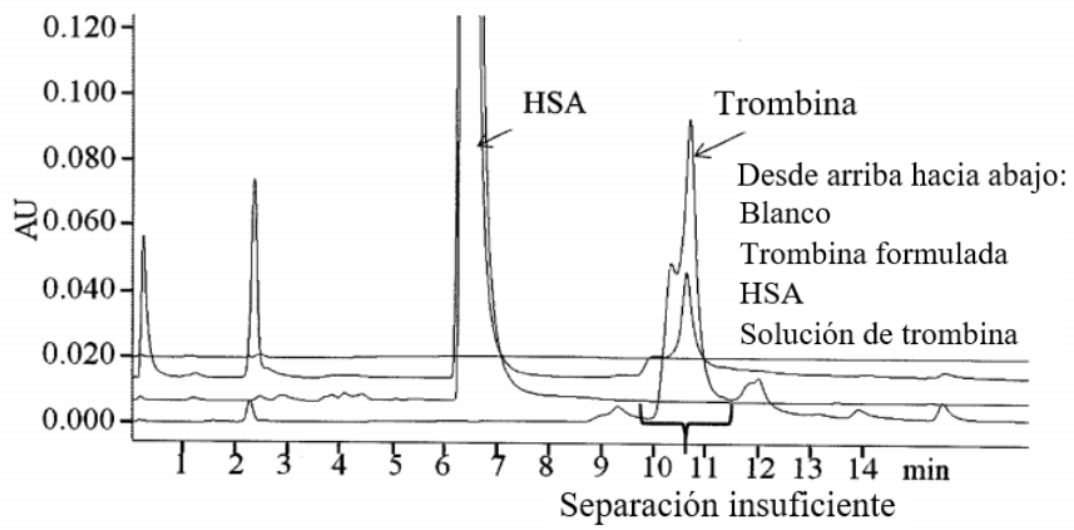


FIGURA 2

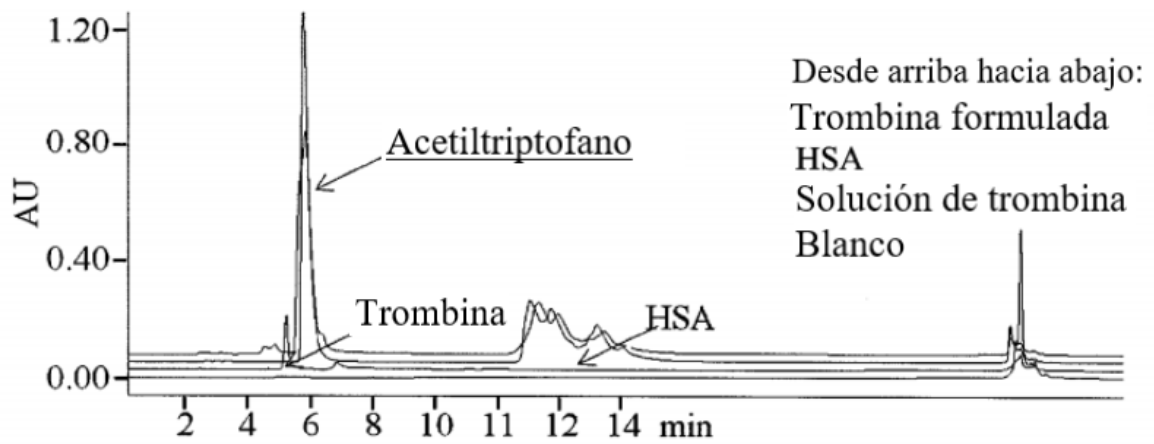


FIGURA 3

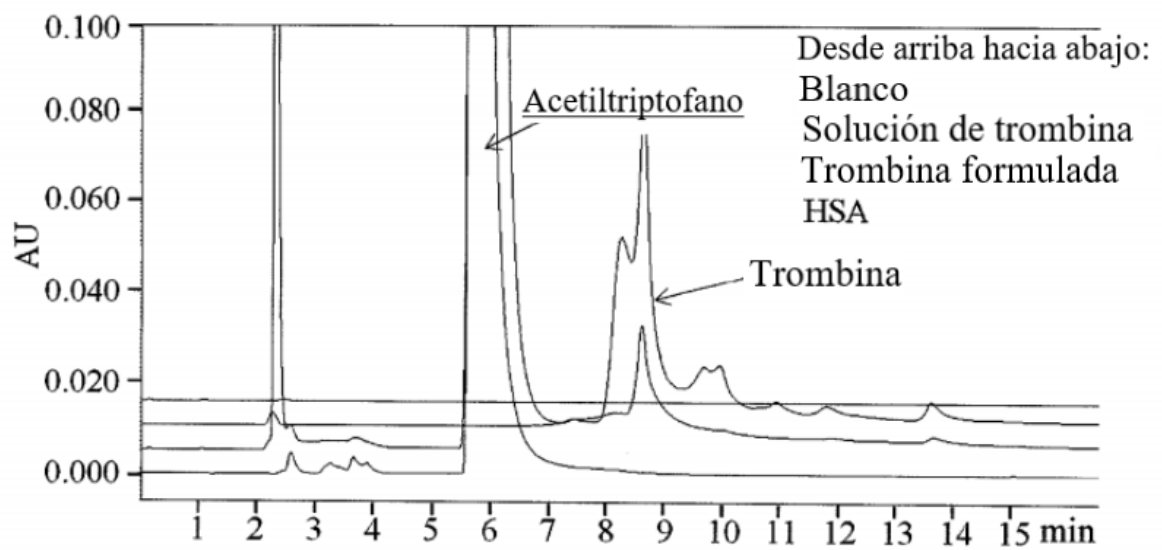


FIGURA 4

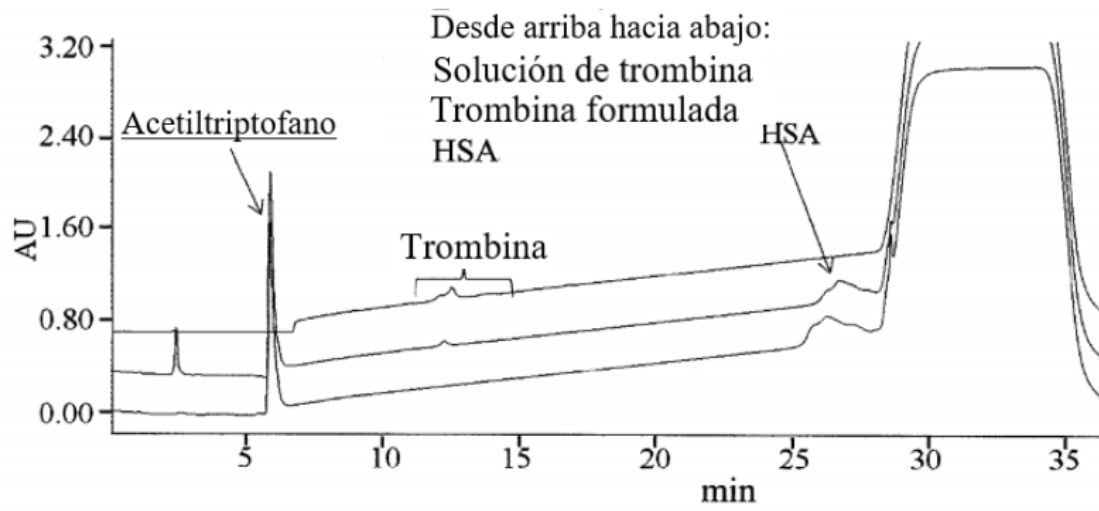


FIGURA 5

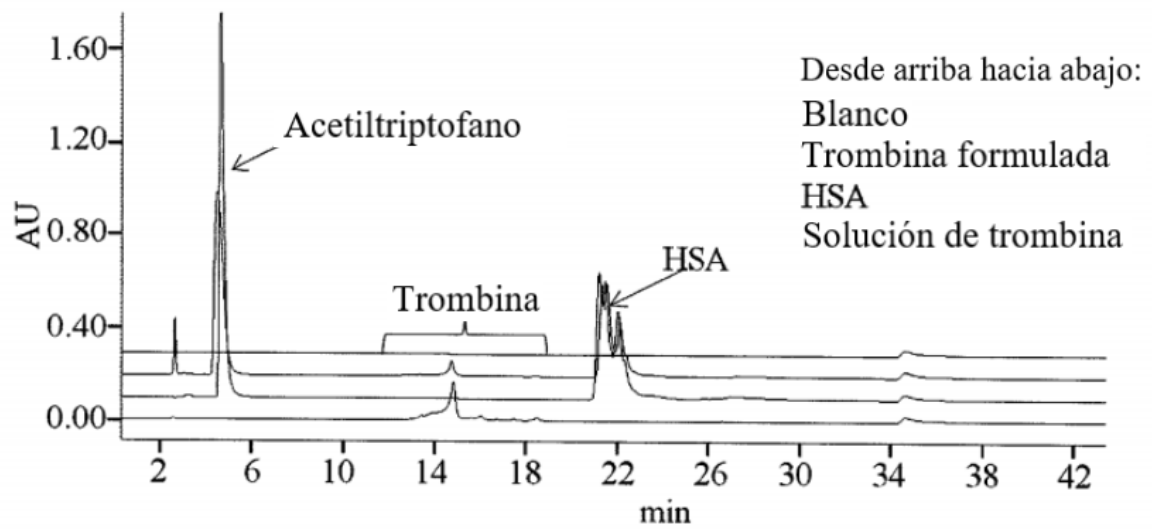


FIGURA 6

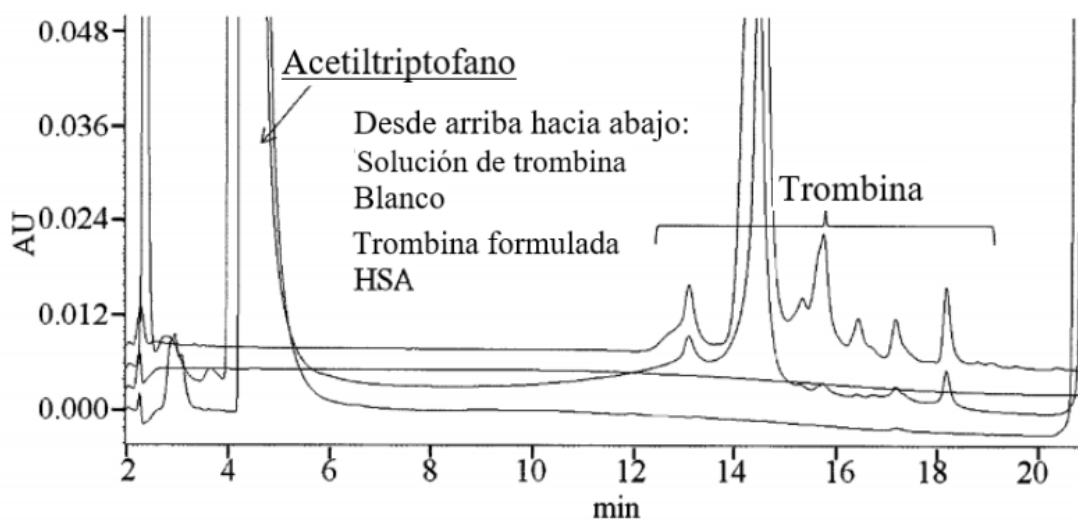


FIGURA 7

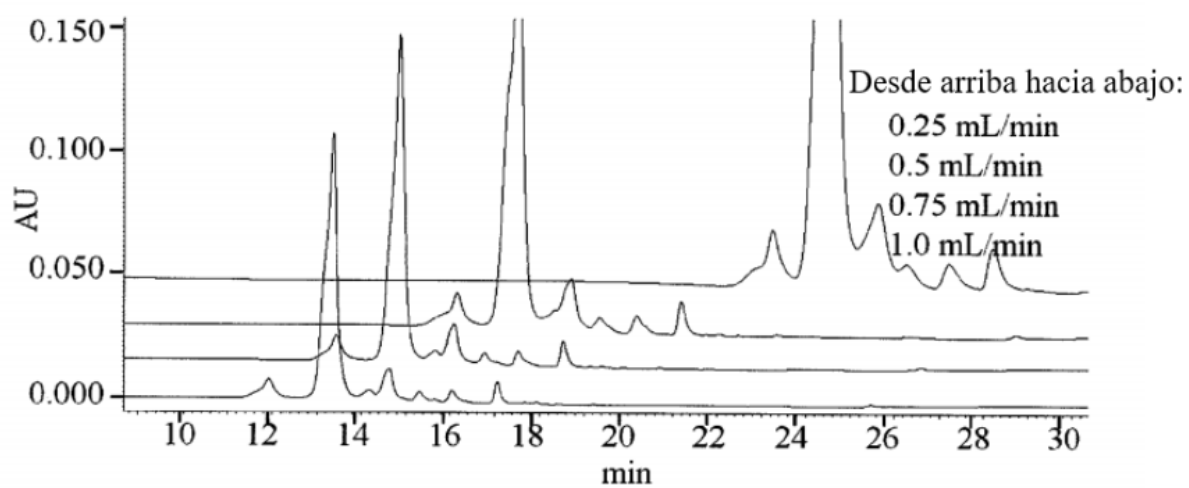


FIGURA 8

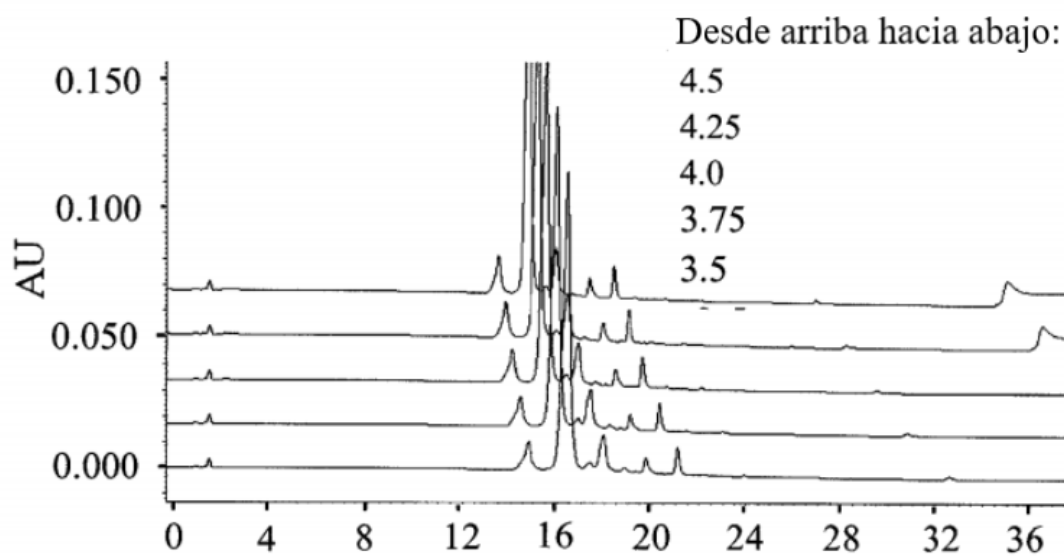


FIGURA9

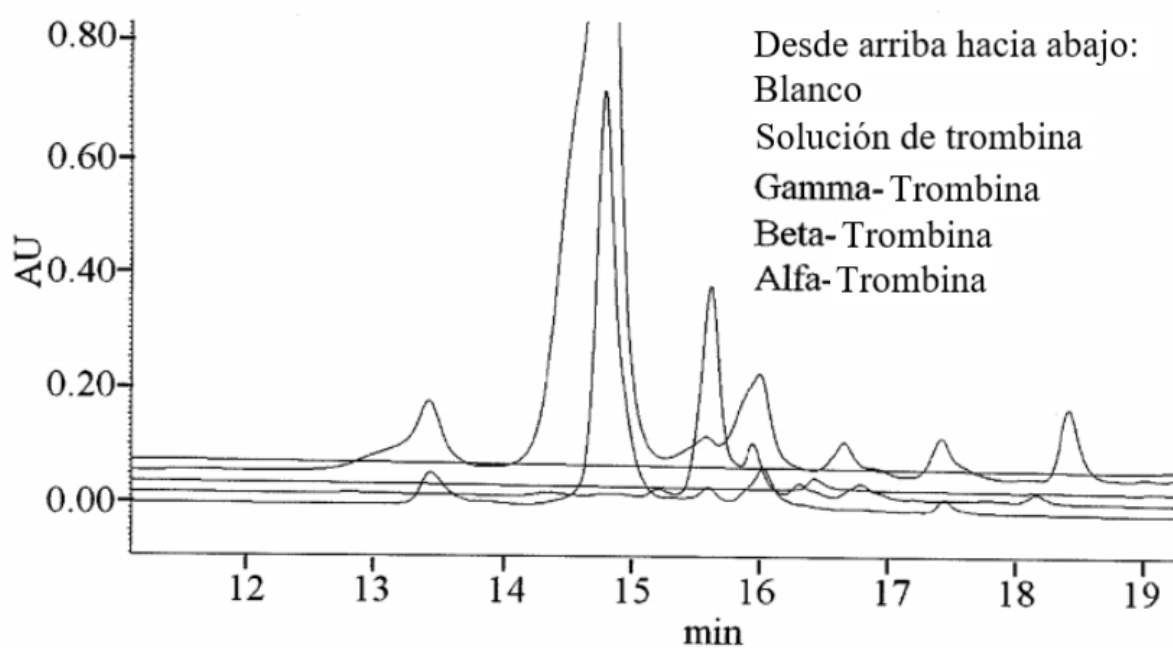


FIGURA10

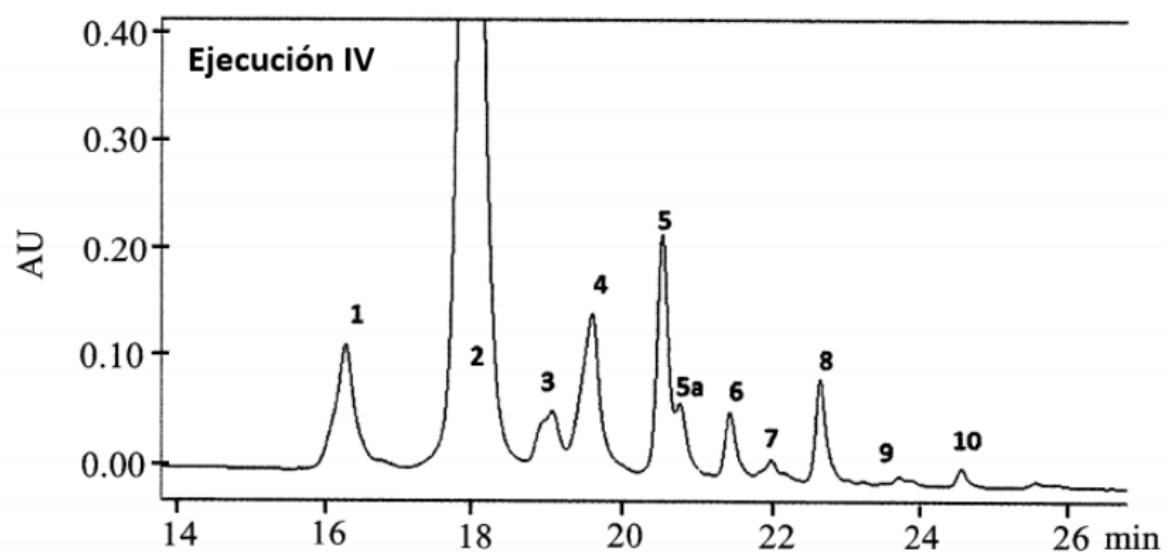


FIGURA 11

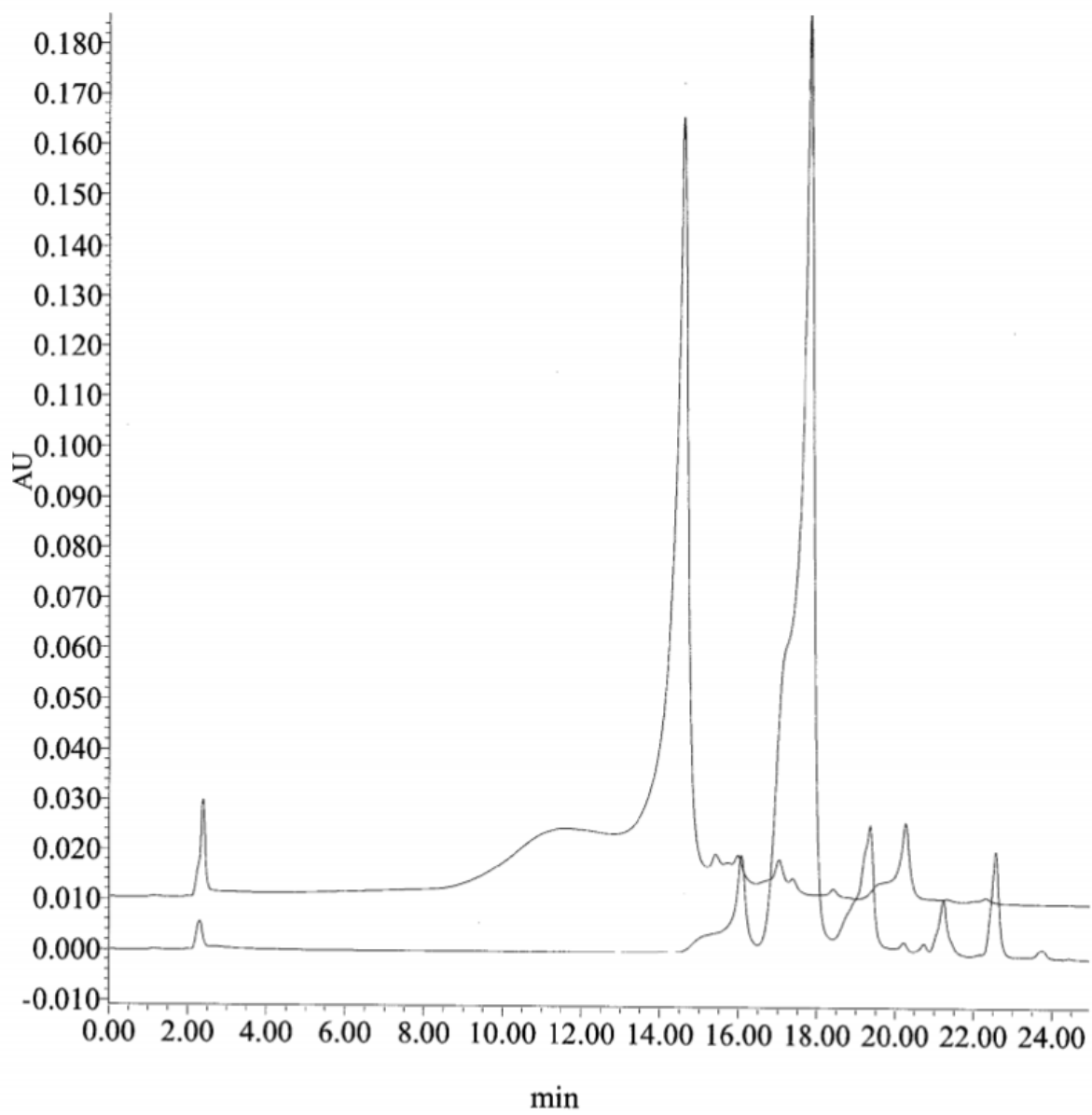


FIGURA 12

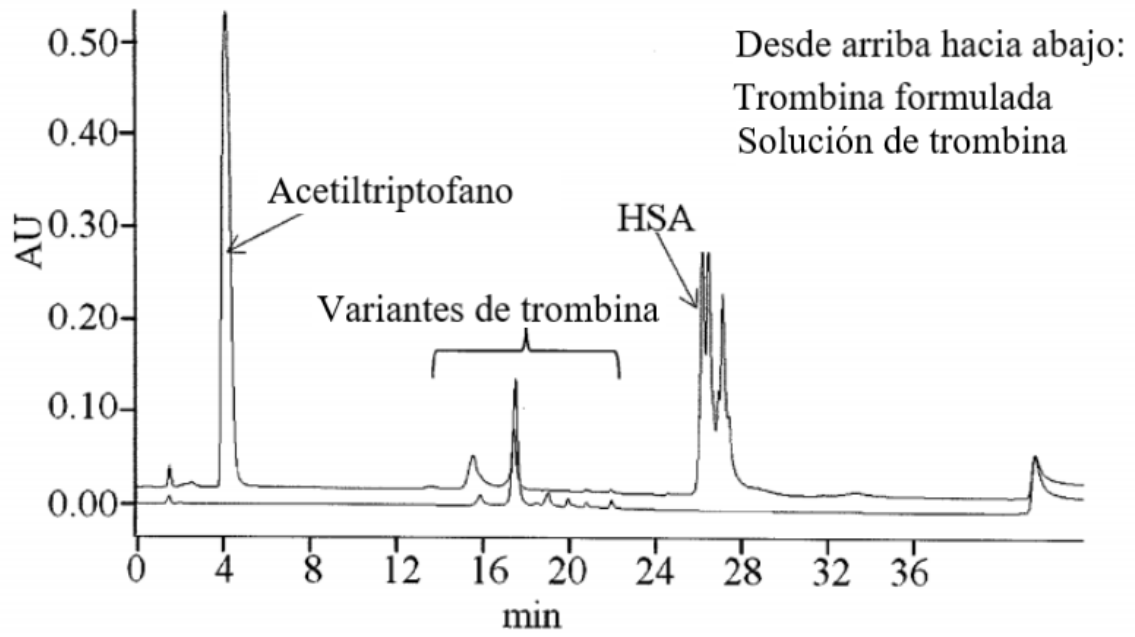


FIGURA 13

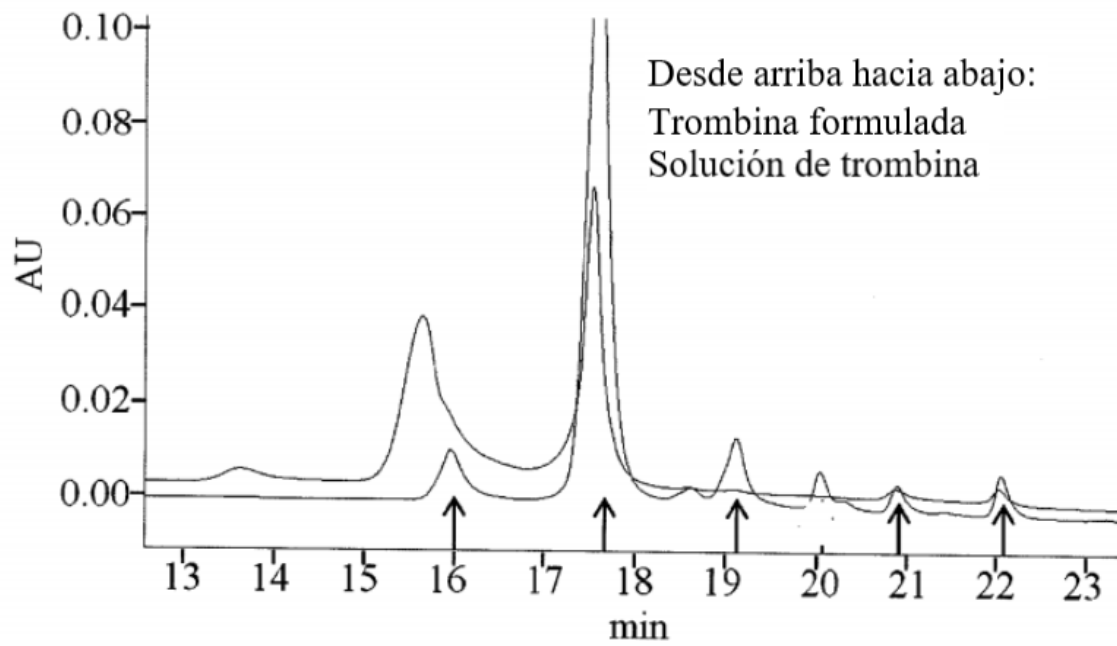


FIGURA 14