

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 173**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00	(2006.01) A61K 47/18	(2007.01)
A61K 47/12	(2006.01) C12N 9/68	(2006.01)
A61K 47/26	(2006.01) A61K 9/08	(2006.01)
A61K 9/19	(2006.01) A61P 17/02	(2006.01)
A61P 1/02	(2006.01)	
A61P 9/10	(2006.01)	
A61P 7/02	(2006.01)	
A61K 38/48	(2006.01)	
A61K 47/02	(2006.01)	
A61K 47/10	(2007.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2015 PCT/CA2015/000606**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16095013**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2015 E 15868755 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024 EP 3233111**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende plasminógeno y usos de este**

30 Prioridad:

19.12.2014 US 201462094556 P

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

19.11.2024

73 Titular/es:

**KEDRION BIOPHARMA INC. (100.0%)
400 Kelby Street, 11th Floor
Fort Lee, NJ 07024, US**

72 Inventor/es:

**ROBITAILLE, MARTIN;
BLACKMAN, DAVIDA;
PLUM, STACY;
GARZON-RODRIGUEZ, WILLIAM y
YU, BETTY**

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 988 173 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

Composición farmacéutica que comprende plasminógeno y usos de este

5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con el campo de la medicina. Más particularmente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende plasminógeno y a los usos terapéuticos de este.

10 Antecedentes de la invención

El plasminógeno es un zimógeno de plasmina tal como se muestra en la Figura 1A. La secuencia de aminoácidos del precursor de plasminógeno humano se muestra en la Figura 1B. El plasminógeno humano contiene 791 aminoácidos (precursor = 810 aminoácidos) con un peso molecular de alrededor de 90 kDa y un pl de aproximadamente 7,0, aunque la glicosilación diferencial y/o la eliminación del péptido de activación del extremo N pueden producir un intervalo de pl de 6,2 a 8,0. Es una proteína de cadena simple con 24 puentes disulfuro intercatenarios, 5 dominios kringle (implicados en la unión a la fibrina y al inhibidor α 2-antiplasmina), un dominio de serina proteasa (P), y un péptido de activación (AP, por su sigla en inglés) que consiste en los primeros 77 aminoácidos. Existe un sitio de glicosilación enlazado a N y un sitio enlazado a O, aunque se ha identificado un segundo sitio enlazado en O (Goldberg, 2006). Aproximadamente 70 % del plasminógeno en circulación contiene únicamente glicosilación enlazada a O mientras que el resto contiene tanto el azúcar enlazado a O como a N.

El plasminógeno natural se produce de dos maneras principales, Glu-Plasminógeno (Glu-Pg) y Lys-Plasminógeno (Lys-Pg), designados por el aminoácido del extremo N de ácido glutámico o lisina. Glu-Pg está compuesto de la secuencia de aminoácidos completa designada por la secuencia génica (que excluye el péptido de activación), mientras que Lys-Pg es el resultado de una escisión del Glu-Pg entre Lys-77 y Lys-78 (subrayado en la Figura 1B). La vida media de circulación de Lys-Pg es considerablemente más corta que la de Glu-Pg (2-2,5 días para Glu-Pg, 0,8 días para Lys-Pg). Glu-Pg es la forma dominante de Pg presente en el plasma con muy poco Lys-Pg detectado en la circulación (Violand, B.N., Byrne, R., Castellino F.J. (1978) The effect of α -, ω -Amino Acids on Human Plasminogen Structure and Activation. J Biol Chem. 253 (15): 5395-5401; Collen D, Ong EB, Johnson AJ. (1975) Human Plasminogen: In Vitro and In Vivo Evidence for the Biological Integrity of NH₂-Terminal Glutamic Acid Plasminogen. Thrombosis Research. 7 (4):515-529).

El plasminógeno se sintetiza en el hígado y se segrega en el plasma. El plasminógeno se distribuye a través del cuerpo y cuando se dan las condiciones para la activación, la proenzima plasminógeno se convierte en la enzima activa, plasmina, mediante el activador tisular del plasminógeno (t-PA) o mediante el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA). Luego, la plasmina degrada la fibrina y convierte las metaloproteinasas de matriz latente (pro-MMP) en MMP activas, que a su vez, degrada adicionalmente la matriz extracelular (ECM) como parte del proceso de remodelación/cicatrización del tejido. La activación del plasminógeno mediada por t-PA está implicada principalmente en la homeostasis de la fibrina, mientras que la generación de plasmina mediante u-PA, que forma un complejo con su receptor u-PAR, tiene una función importante en la remodelación tisular.

La plasmina ha sido estudiada para determinar su uso potencial para la depuración de oclusiones trombóticas en dispositivos artificiales e injertos de hemodiálisis, y para el tratamiento del desprendimiento del vítreo posterior (PVD) (US 6,969,515; US 2010/0104551).

Se investiga al plasminógeno por sus indicaciones terapéuticas tales como cicatrización de heridas, cicatrización de una perforación en la membrana del tímpano, cicatrización de heridas periodontales, enfermedades infecciosas, salud bucal, úlcera diabética, indicaciones de trombosis, tales como trombosis coronaria, lesión por reperfusión en tejidos, isquemia, infarto, edema cerebral, mejora de la microcirculación, y modulación de las vías complementarias (US 8,637,010; US 8,679,482; US 8,318,661; WO 95/12407; EP 0,631,786). Como tal, dicho plasminógeno no se encuentra disponible en el mercado farmacéutico como fármaco actualmente.

Históricamente, Lys-Pg se comercializó farmacéuticamente por un período de tiempo con fines hematológicos y no se ha utilizado con fines científicos o médicos desde 2000. Una formulación de Lys-Pg se describe en Schott et al., 1998, The New England Journal of Medicine, Vol. 339, No. 23, pp. 1679-1686). Mientras que el Lys-Pg se investigó y utilizó con fines clínicos para el tratamiento de la conjuntivitis lefosa, una manifestación clínica de la afección subyacente hipoplasminogenemia (deficiencia de plasminógeno tipo I). Por lo tanto, se ha estudiado la administración sistémica de concentrados de Lys-Pg. Kraft et al. (Kraft J, Lieb W, Zeitler P, Schuster V. (2000) Ligneous conjunctivitis in a girl with severe type I plasminogen deficiency. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 238(9):797-800) explicó que las infusiones diarias de Lys-Pg en un niño con hipoplasminogenemia grave dieron como resultado la resolución parcial de las pseudomembranas conjuntivales. Schott et al. (1998) explicó que, en un niño de 6 meses, el tratamiento con una preparación de

Lys-Pg como infusión continua y luego mediante inyecciones diarias de bolo, provocaron la regresión total de la conjuntivitis leñosa dentro de 4 semanas y normalizaron las secreciones hiperviscosas en el tracto respiratorio así como la cicatrización de heridas en la piel. Schuster et al (Schuster V, Hugle B, Tefs K (2007) Plasminogen deficiency. *J Thromb Haemost* 5(12):2315-2322) indicó que los niveles de plasminógeno en pacientes con hipoplasminogenemia homocigota o heterocigota compuesta (la presencia de alelos mutantes diferentes en locus génico particular, uno en cada cromosoma de un par) oscila de <1 a 9 mg/dL para los niveles en plasma de antígeno de plasminógeno y de <1 % a 51 % para la actividad funcional de plasminógeno. Es importante observar que la mayoría de estos pacientes tienen algún nivel de actividad de plasminógeno residual. Por lo tanto, se espera que el reemplazo de plasminógeno sea eficaz, ya que es una proteína endógena y no se espera que tenga problemas de inmunogenicidad o actividad fibrinolítica. Aunque se han documentado claramente concentrados de plasminógeno sistémicos o tópicos como terapia eficaz que provoca la resolución y evita que se formen nuevas lesiones (Watts, P, Suresh P, Mezer E, Ells A, Albisetti M, Bajzar L, Marzinotto V, Andrew M, Massicotte P, Rootman D (2002) Effective treatment of ligneous conjunctivitis with topical plasminogen. *Am J Ophthalmol* 133(4):451-455, Heidemann DG, Williams GA, Hartzer M, Ohanian A, Citron ME (2003) Treatment of ligneous conjunctivitis with topical plasmin and topical plasminogen. *Cornea* 22(8):760-762; and Schott, 1998), no se encuentra comercialmente disponible ningún producto de plasminógeno no purificado para la terapia tópica o sistémica.

Solo muy recientemente, se han llevado a cabo ensayos clínicos para utilizar Glu-Pg para el tratamiento de la deficiencia de plasminógeno tipo I (identificador de ClinicalTrials.gov: NCT02312180) y una de sus manifestaciones clínicas, la conjuntivitis leñosa, utilizando gotas para los ojos localizadas de Glu-Pg (identificador de ClinicalTrials.gov: NCT01554956).

Las proteínas se pueden estabilizar al cambiar sus características estructurales (internamente) y/o al controlar los componentes en contacto con estas (externamente). Algunas proteínas han presentado desafíos particulares con respecto al manejo y el comportamiento en formulaciones farmacéuticas debido a sus características físico-químicas, que, desafortunadamente, a menudo provocan inestabilidad estructural. Estas pueden someterse a varias degradaciones tal como se ejemplifica a continuación: 1) procesos químicos que provocan la formación de impurezas relacionadas, que pueden implicar hidrólisis, reacciones de oxidación, deamidación, o predisposiciones estructurales tales como truncamientos intramoleculares o iso-asp o 2) un proceso físico que produce agregación/polimerización, generando de ese modo alteraciones estructurales que pueden tener un impacto sobre la actividad biológica y mejorar potencialmente la inmunogenicidad.

El desarrollo de la formulación generalmente se refiere a un proceso en el cual un ingrediente farmacéutico activo (API) logra un grado suficiente tal que puede convertirse en una sustancia farmacológica farmacéuticamente aceptable. Debe realizarse la caracterización biofísica de sustancias farmacológicas para confirmar que la estructura biológicamente activa correctamente plegada se encuentra presente. Se pueden utilizar varias técnicas espectroscópicas (Fluorescencia, CD, DSC, DLS, etc.) para examinar la estructura terciaria de las proteínas en solución y para evaluar la estabilidad y el efecto de las diferentes condiciones de formulación en la estructura de la proteína. (Volkin, D.B. et al. "Preformulation studies as an essential guide to formulation development and manufacture of protein pharmaceutical." *Development and manufacture of protein pharmaceuticals*. Edited by Steve L. Nail and Michael J. Akers, Kluwer Academic 2002 Chapter 1, page 1-39; Cheng, W. et al. "Comparison of High-Throughput Biophysical Methods to Identify Stabilizing Excipients for a Model IgG2 Monoclonal Antibody: Conformational Stability and Kinetic Aggregation Measurements" *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 101, No 5, page 1701-1720, 2012). Además a menudo la industria farmacéutica confirma la integridad estructural del API al realizar un ensayo biológico para la liberación de la sustancia farmacológica. De forma conjunta, se confirma que la formulación preferida no se ha modificado de manera inadvertida por la formulación. El plasminógeno es una proteína que se utiliza principalmente en la preparación de plasmína para indicaciones de trombólisis tal como trombosis coronaria, depuración de oclusiones trombóticas en dispositivos artificiales e injertos de hemodiálisis, y para lesiones a tejidos por reperfusión, el tratamiento de la isquemia, infarto, edema cerebral o para mejorar la microcirculación (WO 95/12407; US 6,969,515; EP 0,631,786).

También se ha descubierto que la administración de plasminógeno es útil en varias indicaciones terapéuticas tales como indicaciones de trombólisis en sujetos con deficiencia de plasminógeno, tal como trombosis coronaria, tratar una lesión de tejido por reperfusión, tratar la isquemia, infarto, edema cerebral, para mejorar la microcirculación, cicatrizar una herida, cicatrizar una perforación en la membrana del tímpano, cicatrizar una herida periodontal, tratar una enfermedad infecciosa, la salud bucal, úlcera diabética, sujetos con deficiencia de plasminógeno y modulación de las vías complementarias (WO 95/12407; EP 0,631,786 US 8,637,010; US 8,679,482; US 8,318,661).

Se encuentran varios desafíos cuando se formula el plasminógeno. Algunos problemas son causados por la contaminación de la plasmína de la formulación de plasminógeno, que degrada el plasminógeno. Se han utilizado varios enfoques para evitar la degradación del plasminógeno, que incluyen la adición de aprotinina, lisina, fluoruro de fenilmetanosulfonilo, inhibidor de la tripsina de la soja, inhibidor de la serina proteasa (US 4,177,262; US 4,361,653, US 5,304,383).

5 Otras dificultades están representadas por la turbidez o la presencia de sustancias filamentosas cuando el plasminógeno se disuelve en un solvente acuoso. Para superar esta desventaja, se ha propuesto combinar plasminógeno, por ejemplo, con un tensioactivo no iónico o con una mezcla de sacarosa, aminoácido y albúmina (WO 94/15631).

El documento US 4,297,344 divulga una composición de plasminógeno que comprende un aminoácido, en particular glicina, en combinación con un carbohidrato, en particular sacarosa/sacarosa.

10 No existe ninguna formulación comercial de Glu-Pg para uso terapéutico en humanos. Las únicas formulaciones de Glu-Pg que se conocen son únicamente con fines de investigación.

Existe la necesidad de desarrollar una composición farmacéutica de plasminógeno.

15 Breve compendio de la invención

El alcance de la invención se define en las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los productos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento.

20 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica como se define en la reivindicaciones 1.

Breve descripción de las figuras

25 La Figura 1A es un esquema de la estructura primaria del plasminógeno que muestra sus dominios kringle, el sitio de escisión de la plasmina y el sitio de unión a la estreptoquinasa.

30 La Figura 1B muestra la secuencia de aminoácidos del precursor de plasminógeno humano. La secuencia de la forma madura se encuentra en negritas, y los dos residuos de lisina entre los cuales hay una escisión para generar Lys-Pg se encuentran subrayados.

La Figura 2 es una fotografía de un vial que contiene el placebo (sin Pg) de la Formulación 1 luego de la liofilización.

35 La Figura 3 es una fotografía de un vial que contiene la Formulación 1 (descrita en la Tabla 1A) luego de la liofilización.

La Figura 4 es una fotografía de un vial que contiene el placebo (sin Pg) de la Formulación 2 luego de la liofilización.

40 La Figura 5 es una fotografía de un vial que contiene la Formulación 2 (descrita en la Tabla 1A) luego de la liofilización.

La Figura 6 es una fotografía de un vial que contiene el placebo (sin Pg) de la Formulación 3 luego de la liofilización.

45 La Figura 7 es una fotografía de un vial que contiene la Formulación 3 (descrita en la Tabla 1A) luego de la liofilización.

50 La Figura 8 es una fotografía de un vial que contiene el placebo (sin Pg) de la Formulación 4 luego de la liofilización.

La Figura 9 es una fotografía de un vial que contiene la Formulación 4 (descrita en la Tabla 1A) luego de la liofilización.

55 La Figura 10 es una fotografía de un vial que contiene el placebo (sin Pg) de la Formulación 5 luego de la liofilización.

La Figura 11 es una fotografía de un vial que contiene la Formulación 5 (descrita en la Tabla 1A) luego de la liofilización.

60 La Figura 12 es una imagen de viales de la composición liofilizada n.º F0498, que contiene 20 mg/ml de plasminógeno en Tris-HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0 y arginina 28,5 mM (0,5 %).

65 La Figura 13 es una imagen de viales de la composición liofilizada n.º F0449, que contiene 10 mg/ml de plasminógeno en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %) y manitol 54 mM (1 %).

La Figura 14 es una imagen de viales de la composición liofilizada n.º F0459, que contiene 20 mg/ml de plasminógeno en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %) y manitol 54 mM (1 %).

5 La Figura 15 es una fotografía de viales que contienen 5 mg/ml de plasminógeno en agua (Muestra 0), en amortiguador de citrato de sodio 10 mM pH 6,5 (Muestra 1), amortiguador de fosfato de sodio 10 mM pH 7,2 (Muestra 2) y amortiguador de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 (Muestra 3) además de los estándares de turbidez de 0,02, 20, 100, 800 NTU respectivamente.

10 La Figura 16 es una fotografía de los mismos viales que se muestran en la Figura 12, con la excepción de que se ha agregado NaCl 35 mM y Arg 28,5 mM (0,5 %) a las Muestras 1, 2 y 3.

15 Las Figuras 17, 18 y 19 son gráficas que muestran la turbidez durante un período de 4 horas para composiciones que contienen 10 mg de plasminógeno, NaCl 35 mM con glicina, arginina, alanina al 0,5 % y sin aminoácidos, a pH 6,5 en amortiguador citrato de sodio (Figura 17), pH 7,2 en amortiguador fosfato de sodio (Figura 18) y a pH 8,0 en amortiguador Tris (Figura 19).

20 Las Figuras 20, 21 y 22 son gráficas que muestran la turbidez durante un período de 4 horas para composiciones que contienen 10 mg de plasminógeno, NaCl 35 mM, manitol al 0,5 % con glicina, arginina, alanina al 0,5 % y sin aminoácidos, a pH 6,5 en amortiguador citrato de sodio (Figura 20), pH 7,2 en amortiguador fosfato de sodio (Figura 21) y a pH 8,0 en amortiguador Tris (Figura 22).

Descripción detallada de la invención

25 La composición farmacéutica según la invención tiene un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0; más preferiblemente de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0; y aún más preferiblemente de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5

30 La presente invención concierne una composición farmacéutica con un aumento de potencia. La presente invención concierne una composición farmacéutica, que tiene un conteo de partículas de 10 µm o mayor, que es menor que 6000 partículas cada 100 mL de composición, o menor que 5000 partículas cada 100 mL de composición, o menor que 4000 partículas cada 100 mL de composición, o menor que 3000 partículas cada 100 mL de composición, o menor que 2000 partículas cada 100 mL de composición o menos que 1000 partículas cada 100 mL de composición. En una realización de la presente invención, el conteo de partículas permanece bajo luego de la liofilización y reconstitución. En una realización de la presente invención, las repetidas preparaciones de la misma composición no genera variaciones en el conteo de partículas.

40 El plasminógeno es una proenzima que se convierte en enzima activa, plasmina, mediante el activador tisular del plasminógeno (t-PA) o mediante el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA). Luego, la plasmina degrada la fibrina y convierte las metaloproteinasas de matriz latente (pro-MMP) en MMP activas, que a su vez, degrada adicionalmente la matriz extracelular (ECM) como parte del proceso de remodelación/cicatrización del tejido. Tal como se usa en la presente, el término "variante biológicamente activa" se refiere a un polipéptido de plasminógeno mutado que retiene la actividad biológica del plasminógeno natural es decir, la capacidad de convertirse en un polipéptido de plasmina (mediante t-PA y/o u-PA) que es capaz de degradar la fibrina y de convertir las metaloproteinasas de matriz latente (pro-MMP) en MMP activas.

45 Las variantes biológicamente activas pueden exhibir una actividad biológica (por ejemplo, actividad enzimática de la plasmina resultante) que es menor, mayor o similar a la de un polipéptido de plasminógeno natural. En las realizaciones, la variante tiene al menos 90 o 95 % de identidad de secuencia con un polipéptido de plasminógeno natural. Las variantes de plasminógeno biológicamente activas se describen, por ejemplo, en WO2012/093132, WO2013/024074 y en Wang et al. (1995, Protein Science 4, 1758-1767), e incluyen las variantes truncas de plasminógeno a las cuales se hace referencia comúnmente como "midiplasminógeno", "miniplasminógeno", "microplasminógeno" y "delta-plasminógeno" que carecen de uno o más dominios kringle y/o partes de estos. En una realización, el plasminógeno es plasminógeno humano. En una realización adicional, la composición comprende un plasminógeno humano natural. El plasminógeno puede obtenerse de diversas fuentes. Puede obtenerse por síntesis recombinante o extraerse/purificarse de la sangre, el plasma o una solución derivada de la sangre. El plasminógeno puede extraerse de la sangre o el plasma mediante fraccionamiento de Cohn o mediante precipitación. El plasminógeno puede purificarse a partir del plasma o una solución derivada de la sangre mediante cromatografía de afinidad de unión, tal como el método que se describe en WO 2006/120423, o producirse de forma recombinante.

60 En una realización, el plasminógeno o variante biológicamente activa de este se presenta en una concentración de alrededor de 0,01 mg/ml a alrededor de 80 mg/ml; preferentemente alrededor de 1 mg/ml a alrededor de 60 mg/ml; preferentemente de alrededor de 5 mg/ml a alrededor de 60 mg/ml; preferentemente alrededor 5 mg/ml a alrededor de 40 mg/ml; preferentemente alrededor 2 mg/ml a alrededor de 30 mg/ml, más preferentemente de alrededor 2 mg/ml a alrededor de 20 mg/ml, y aún más preferentemente alrededor de 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05 o 0,01 mg/ml.

En una realización de la presente invención, el plasminógeno o variante biológicamente activa de este comprendido en la composición farmacéutica tiene una pureza de más que alrededor de 80 %, o más que alrededor de 90 %, o más que alrededor de 95 %, o más que alrededor de 98 %. El término "alrededor de" hace referencia a una variación de valor de más o menos 10 %.

5

El pH de la composición de la presente es de alrededor de 5,0 a alrededor de 8,0; de alrededor de 6,0 a alrededor de 8,0; o de alrededor de 6,5 a alrededor de 7,5. En realizaciones, el pH de la composición de la presente puede ser de alrededor de 5,0, 5,5, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 u 8,0. Para mantener la composición a dicho pH, la composición de la presente preferentemente comprende un amortiguador. Se pueden utilizar varios amortiguadores dentro del alcance de la presente invención, lo que incluye los siguientes amortiguadores en función del pH deseado (sólo las composiciones con un pH de aproximadamente 5,0 a 8,0 se ajustan a las reivindicaciones):

10

Amortiguador	pH deseado
Citrato/fosfato	3,0 ,3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 a 7,0, 7,5, 8,0, y cualquier pH de 2,0 a 8,0
Citrato	3,0 a 6,5
Acetato	cualquier pH de 3,6 a 5,6, por ejemplo, 4,0, 4,5, 5,0, o 5,5
Acetato de sodio	3,6 a 5,6
Formiato	3,0 a 4,5
Formiato de sodio	cualquier pH de 5,0 a 6,0, por ejemplo, 5,0, 5,5, o 6,0
Malato	4,0 a 6,0
Fosfato	cualquier pH de 6,5 a 8,0, por ejemplo, 6,5, 7,0, 7,5 u 8,0
PBS, TBS, TNT, PBT	7,0 a 7,5
Fosfato de Sorensen	5,8 a 8,0
Succinato	cualquier pH de 5,5 a 6,5, por ejemplo, 6,0
Carbonato	cualquier pH de 6,0 a 8,0, por ejemplo, 6,5
Histidina	cualquier pH de 5,0 a 7,0, por ejemplo, 5,0, 5,5, 6,0 o 6,5 a 7,0
Borato	9 a 10
Glicina-NaOH	8,6 a 10
Succinato	5,5 a 6,5
Maleato	5,5 a 7,2
Tris	7,2 a 9,0
BIS-Tris	cualquier pH de 5,8 a 7,2
PIPES	cualquier pH de 6,1 a 7,5
MOPS	cualquier pH de 6,2 a 7,6
HEPES	cualquier pH de 6,8 a 8,2
MES	cualquier pH de 5,5 a 6,7
ACES	cualquier pH de 6,1 a 7,5

15

En una realización, el amortiguador comprende una combinación de dos amortiguadores; tal como Citrato/fosfato, Citrato/Histidina, Acetato/Histidina o Succinato/Histidina. En una realización de la presente invención, el amortiguador no comprende un amortiguador de citrato. En otra realización el amortiguador es citrato, fosfato ($K_2HPO_4/NaHPO_4$), histidina o succinato. En otra realización el amortiguador es fosfato ($K_2HPO_4/NaHPO_4$), histidina o succinato.

20

En una realización, la concentración del amortiguador es de alrededor de 10 mM a alrededor de 50 mM, o de alrededor de 10 mM a alrededor de 30 mM, por ejemplo, alrededor de 2 mM o alrededor de 10 mM.

25

Tal como se usa en la presente "un modificador de tonicidad" se refiere a un compuesto que se utiliza para ajustar la tonicidad de la composición farmacéutica. Según algunas realizaciones, la osmolalidad oscila entre 180 mOsm y 350 mOsm aproximadamente. En una realización, el modificador de tonicidad se encuentra presente en una cantidad que hace que la composición se vuelva isotónica. En otra realización, el modificador de tonicidad se encuentra presente en una cantidad que hace que la composición se vuelva hipertónica o hipotónica. "Isotónica" se refiere a que la composición de la presente invención tiene esencialmente la misma osmolaridad que la osmolaridad de la sangre humana. Generalmente, las composiciones isotónicas tienen una osmolaridad de alrededor de 250 mOsm a alrededor de 330 mOsm. La osmolaridad puede medirse utilizando un osmómetro de punto de congelación o presión de vapor, por ejemplo. El modificador de tonicidad es cloruro de sodio. En una realización, la concentración del modificador de tonicidad es de alrededor de 34 mM, o alrededor de 35 mM, o alrededor de 68 mM, o alrededor de 75 mM. En una realización, la concentración del modificador de tonicidad se ajusta de modo que la osmolaridad resultante de la composición está comprendida dentro del intervalo deseado.

35

En una realización, la composición comprende además un agente espesante. Tal como se usa en la presente, el "agente espesante" se refiere a un compuesto/agente que aumenta la masa volumétrica de una composición. Los ejemplos de agentes volumétricos incluyen, de modo no taxativo, glicina, ácido glutámico, alanina, manitol,

almidón de hidroetilo, dextrano, PVP (polivinilpirrolidona), manitol, sorbitol, azúcares alcohólicos derivados de oligosacáridos, maltitol, lactitol, maltotriitol, xilitol, polietilenglicol, sacarosa, glucosa, maltosa, sorbitol, o cualquier combinación de estos. Estos agentes también pueden servir como modificadores de tonicidad. En realizaciones, la concentración del agente espesante es de alrededor de 50 mM a alrededor de 300 mM; o de alrededor de 100 mM a alrededor de 200 mM, o alrededor de 150 mM, o de alrededor de 50 mM a alrededor de 150 mM, o alrededor de 108 mM, o alrededor de 54 mM.

En una realización, el modificador de tonicidad y el agente espesante se encuentran en concentraciones de modo que la relación de modificador de tonicidad/agente espesante es de alrededor de 1,0 a alrededor de 15,0 (p/p); de alrededor de 1,0 a alrededor de 10,0, de alrededor de 3,0 a alrededor de 10,0, de alrededor de 5,0 a alrededor de 10,0, por ejemplo, alrededor de 5,0, alrededor de 8,0 o alrededor de 10,0. En una realización, la concentración del agente espesante se ajusta en función de la concentración del modificador de tonicidad de modo que la relación de modificador de tonicidad/agente espesante se encuentra en el intervalo deseado.

En realizaciones, la composición comprende además uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables tales como portadores, excipientes, diluyentes, estabilizadores, amortiguadores y similares.

En una realización, la composición farmacéutica comprende además un azúcar, por ejemplo, un azúcar reductora o y/o no reductora. Tal como se usa en la presente, un "azúcar reductora" es aquella que contiene un grupo hemiacetal que puede reducir iones metálicos o reaccionar de forma covalente con lisina y otros grupos amino en proteínas y un "azúcar no reductora es aquella que no tiene estas propiedades de un azúcar reductora. En una realización, el azúcar reductora es fructosa, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa, glucosa o cualquier combinación de estas. En una realización, el azúcar no reductora es sacarosa, trehalosa, sorbosa, melezitosa, rafinosa, o cualquier combinación de estas. En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención se liofiliza en presencia de un azúcar reductora. En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención se liofiliza en presencia de un azúcar no reductora.

En realizaciones, la composición farmacéutica de la presente invención tiene una osmolaridad de alrededor de 180 mOsm a alrededor de 350 mOsm; o de alrededor de 250 mOsm a alrededor de 350 mOsm, o de alrededor de 200 mOsm a alrededor de 300 mOsm.

Tal como se usa en la presente, un "agente estabilizante" se refiere a un agente que estabiliza el plasminógeno en la solución. El agente estabilizante es un aminoácido que es arginina o glicina. En una realización, dicho aminoácido puede encontrarse en forma de una base de aminoácido tal como clorhidrato de arginina. La concentración de aminoácidos es de alrededor de 10 mM a alrededor de 100 mM, o de alrededor de 25 mM a alrededor de 75 mM, o alrededor de 10 mM, o alrededor de 25 mM, o alrededor de 50 mM, o alrededor de 75 mM, o alrededor de 100 mM.

En otra realización, la composición farmacéutica de la presente invención comprende además un antioxidante. En una realización, el antioxidante es metionina, glutatión oxidado (Glu-Cys-Gly)₂ (613 kDa), ácido ascórbico, N-acetil-L-cisteína/homocisteína, glutatión, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®), ácido lipoico, tiosulfato de calcio, platino, glicina-glicina-histidina (tripéptido), hidroxitolueno butilado (BHT), o cualquier combinación de estos. En realizaciones, la concentración del antioxidante es de alrededor de 10 mM a alrededor de 200 mM, por ejemplo, de alrededor de 10 mM a alrededor de 50 mM, alrededor de 100 mM, alrededor de 150 mM o alrededor de 200 mM.

En otra realización, la composición farmacéutica de la presente invención comprende además un tensioactivo. Tal como se usa en la presente, un "tensioactivo" se refiere a un compuesto/agente que reduce la tensión interfacial entre un líquido y un sólido cuando se disuelven en solución. En una realización, el tensioactivo es Polysorbate® 80, Polysorbate® 20, Pluronic® F-68, o Brij® 35, poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188 o Pluronic® F-68); Triton®; dodecilsulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés); laurilsulfato de sodio; octilglucósido de sodio; lauril, miristil, linoleil, o estearil-sulfobetaina; lauril, miristil, linoleil o estearil-sarcosina; linoleil, miristil, o cetil-betaína; lauroamidopropilo, cocamidopropilo, linoleamidopropilo, miristamidopropilo, palmidopropilo o isostearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropil); miristamidopropil, palmidopropil o isostearamidopropil-dimetilamina; metilcooiltaurato de sodio o metiloleiltaurato de disodio y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.); polietilglicol, polipropilglicol, y copolímeros de etileno y propilenglicol o cualquier combinación de estos. En una realización, la concentración de tensioactivo se ajusta para reducir la agregación de plasminógeno, variante biológicamente activa o fragmento de este y/o minimiza la formación de particulados en la composición y/o reduce la adsorción. En una realización, el tensioactivo se encuentra presente en la composición en una concentración de alrededor de 0,001-1 % (p/v), alrededor de 0,002 % a alrededor de 0,02 % (p/v), o alrededor de 0,002 % a alrededor de 0,006 % (p/v). En algunas realizaciones, la composición comprende un tensioactivo que es un poloxámero. En algunas realizaciones, la composición comprende Pluronic® F68. En realizaciones particulares, la composición comprende de alrededor de 0,01 % (p/v) a alrededor de 1 % (p/v) de Pluronic® F68, por ejemplo alrededor de 0,1 % (p/v) de Pluronic® F68. En una realización, la composición sustancialmente no contiene o no contiene tensioactivo no iónico, por

ejemplo, la composición comprende menos de 0,02 %, 0,01 %, 0,006 %, o 0,004 % (p/v) de tensioactivo no iónico.

5 En otra realización, la composición farmacéutica de la presente invención comprende además un estabilizante polimérico. En una realización, el estabilizante polimérico es Heparina (6 a 30 kDa); ácido poliamino (2 a 100 kDa) tal como Poli (Glu), Poli (Asp), y Poli (Glu, Phe); Carboximetilcelulosa (10-800 cps); Ciclodextrina; sulfato de dextrano, o cualquier combinación de estos. En realizaciones, la concentración del estabilizante polimérico es de alrededor de 0,001 % a alrededor de 0,50 %, o de alrededor de 0,001 % a alrededor de 0,25 %.

10 En otra realización, la composición farmacéutica de la presente invención comprende además un polietilenglicol, por ejemplo, PEG 200, PEG 400, PEG 1000, PEG, 4000, PEG, 8000 PEG 10 000, o cualquier combinación de estos. En una realización, la concentración del polietilenglicol es de alrededor de 0,5 % a alrededor de 10 % (p/p).

15 En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención comprende además un conservante. Tal como se usa en la presente, un "conservante" se refiere a un compuesto/agente que se puede agregar a la composición farmacéutica para reducir esencialmente la actividad bacteriana en esta, facilitando de ese modo la producción de una composición farmacéutica multiuso, por ejemplo. Los ejemplos de conservantes
20 incluyen m-cresol, alcohol bencílico, metanol, etanol, iso-propanol, butilparabeno, etilparabeno, metilparabeno, fenol, glicerol, xilitol, resorcinol, catecol, 2,6-dimetilciclohexanol, 2-metil-2,4-pentadiol, dextrano, polivinilpirrolidona, 2-clorophenol, cloruro de bencetonio, mertiolato (timerosal), ácido benzoico (propilparabeno) MW 180,2, ácido benzoico MW 122,12, cloruro de benzalconio, clorobutanol, benzoato de sodio, propionato de sodio o cloruro de cetilpiridinio. El conservante se selecciona para que sea compatible
25 con el amortiguador y otros componentes de la composición farmacéutica (es decir, la solución es transparente). Por ejemplo, cuando el amortiguador es acetato de sodio o fosfato de sodio, los conservantes compatibles incluyen metanol, etanol, iso-propanol, glicerol, resorcinol, 2-metil-2,4-pentadiol, mertiolato (timerosal), cloruro de benzalconio, benzoato de sodio o cloruro de cetilpiridinio. La concentración del conservante que se utiliza en la composición de la presente se puede determinar de acuerdo con el criterio del
30 experto en la técnica. En algunas realizaciones, la concentración del conservante es alrededor de 0,005 a alrededor de 10 % (p/v), de alrededor de 0,1 a alrededor de 1,0 % (p/v), o de alrededor de 0,3 a alrededor de 0,7 % (p/v). En algunas realizaciones, la concentración del conservante es alrededor de 0,005, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, o 1,0 % (p/v).

35 En otra realización, la composición farmacéutica de la presente invención no contiene conservantes.

Uno o más portadores, excipientes o estabilizadores adicionales farmacéuticamente aceptables, tales como aquellos descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 19.^a edición, Osol, A. Ed. (1995) pueden incluirse
40 en la composición de la presente siempre que no afecten sustancialmente de manera adversa las características deseadas de la composición farmacéutica de la invención. Los elementos constitutivos adicionales de la composición de la presente invención pueden incluir agua, por ejemplo, agua para inyección, aceite vegetal, un agente espesante, tal como metilcelulosa, un antiadsorbente, un agente humectante, antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina, agentes quelante tales como EDTA, complejos
45 metálicos (por ejemplo complejos de proteínas y Zn), polímeros biodegradables tales como poliésteres, y/o contraiones que forman sales, tales como sodio, etc. Los portadores, excipientes o estabilizantes adecuados se encuentran presentes en una cantidad que no resulta tóxica para los sujetos en las dosificaciones y concentraciones empleadas.

50 En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención tiene un peso total de sólido de alrededor de 3,5 % a alrededor de 8 % cuando se encuentra liofilizada, preferentemente de alrededor de 3,5 % a alrededor de 6 %, y más preferentemente de alrededor de 3,8 % a alrededor de 5,5 %. El aumento de la concentración de los componentes de la composición farmacéutica de la invención produce un aumento del % total de sólido en la composición liofilizada y mejora la apariencia de torta de la composición liofilizada.

55 En una realización, el plasminógeno o la variante de este se compone de varios tipos de plasminógeno y/o variantes. Las las realizaciones según la invención, el contenido de Glu-plasminógeno representa más que 80 % del contenido total de plasminógeno o la variantes de este, o más que 90 %.

60 Una realización de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende plasminógeno o una variante de este, donde la cantidad total de proteína diferente a plasminógeno o una variante de este en la composición es menos de alrededor de 10 %, menos de alrededor de 5 %, o menos de alrededor de 2 %. Una realización de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende plasminógeno o una variante de este, donde la composición no comprende o sustancialmente no contiene una proteína
65 adicional (es decir, además del plasminógeno o variante de este). En una realización de la presente invención, la composición no comprende o sustancialmente no contiene albúmina. En una realización de la presente invención, la composición no comprende o sustancialmente no contiene aptrotinina. En una realización de la

presente invención, la composición no comprende o sustancialmente no contiene un inhibidor de tripsina. En una realización de la presente invención, la composición no comprende o sustancialmente no contiene un inhibidor de serina proteasa. En una realización de la presente invención, la composición no comprende o sustancialmente no contiene plasmina. En una realización de la presente invención, la composición sustancialmente no contiene o no comprende un tensioactivo, es decir, la concentración de tensioactivo es menor que 0,01 mM.

En una realización, la composición farmacéutica que comprende el plasminógeno de la presente invención es estable a temperatura ambiente durante al menos 2 horas, 24 horas, una semana o un mes.

- 10 En una realización, la composición farmacéutica que comprende el plasminógeno de la presente invención es estable a una temperatura por debajo de 0 °C durante al menos 3 meses, durante al menos 6 meses, durante al menos 12 meses o durante al menos 24 meses. Dicha temperatura por debajo de 0 °C es alrededor de -20 °C, alrededor de -30 °C, alrededor de -60 °C, alrededor de -70 °C o alrededor de -80 °C.
- 15 En realizaciones, la composición farmacéutica que comprende el plasminógeno es una composición líquida, una composición líquida adecuada para liofilización, una composición líquida adecuada para congelamiento, una composición liofilizada, una composición congelada o una composición reconstituida.

20 El término "composición farmacéutica" designa una composición para fines farmacéuticos, médicos o terapéuticos.

25 En la Tabla 1A se representan ejemplos representativos de composiciones farmacéuticas de plasminógeno (Pg). En la Tabla 1A, sólo las composiciones que comprenden NaCl en una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 10 mM están de acuerdo con las reivindicaciones..

Tabla 1A

N.º	Pg	Amortiguador	Agente de carga:	Agente estabilizador	Modificador de tonicidad	pH
1	5 mg/ml	Citrato 10 mM	Sacarosa 73 mM	Glicina 67 mM	NaCl 68,4 mM;	6,5
2	5 mg/ml	Citrato 10 mM	Sacarosa 73 mM	Glicina 33,5 mM	NaCl 34,22 mM	6,5
3	5 mg/ml	Citrato 10 mM	Sacarosa 117 mM	Glicina 67 mM	NaCl 68,4 mM;	6,5
4	5 mg/ml	Citrato 10 mM	Sacarosa 117 mM	Glicina 67 mM	NaCl 34,22 mM	6,5
5	5 mg/ml	Citrato 10 mM	Sacarosa 73 mM	Glicina 67 mM	NaCl 34,22 mM	6,5
6	5 mg/ml	Citrato 10 mM	Sacarosa 73 mM	Glicina 67 mM	NaCl 75,3 mM	6,5
7	5 mg/ml	Citrato 10 mM	Sacarosa 79 mM	Glicina 40 mM	NaCl 75 mM	6,5
8	5 mg/ml	Citrato 10 mM	Sacarosa 77 mM	Glicina 47 mM	NaCl 75 mM	6,5
9	5 mg/ml	Citrato 10 mM	Sacarosa 75 mM	Glicina 54 mM	NaCl 75 mM	6,5
10	5 mg/ml	Citrato 10 mM	Sacarosa 50-150 mM	Glicina 25 a 75 mM	NaCl 35-150 mM	6,5
11	5 mg/ml	Citrato 10 mM	Manitol 50-150 mM	Glicina 25 a 75 mM	NaCl 35-150 mM	6,5
12	5 mg/ml	Citrato 10 mM	Sorbitol 50-150 mM	Glicina 25 a 75 mM	NaCl 35-150 mM	6,5
13	5 mg/ml	Citrato 10 mM	Sacarosa 50-150 mM	Arginina 25 a 75 mM	NaCl 35-150 mM	6,5
14	5 mg/ml	Citrato 10 mM	Manitol 50-150 mM	Arginina 25 a 75 mM	NaCl 35-150 mM	6,5
15	5 mg/ml	Citrato 10 mM	Sorbitol 50-150 mM	Arginina 25 a 75 mM	NaCl 35-150 mM	6,5
16	5 mg/ml	Fosfato 10 mM	Sacarosa 50-150 mM	Glicina 25 a 75 mM	NaCl 35-150 mM	7,2
17	5 mg/ml	Fosfato 10 mM	Manitol 50-150 mM	Glicina 25 a 75 mM	NaCl 35-150 mM	7,2
18	5 mg/ml	Fosfato 10 mM	Sorbitol 50-150 mM	Glicina 25 a 75 mM	NaCl 35-150 mM	7,2
19	5 mg/ml	Fosfato 10 mM	Sacarosa 50-150 mM	Arginina 25 a 75 mM	NaCl 35-150 mM	7,2
20	5 mg/ml	Fosfato 10 mM	Manitol 50-150 mM	Arginina 25 a 75 mM	NaCl 35-150 mM	7,2
21	5 mg/ml	Fosfato 10 mM	Sorbitol 50-150 mM	Arginina 25 a 75 mM	NaCl 35-150 mM	7,2

30 Otros ejemplos representativos de las composiciones farmacéuticas están representados en la Tabla 1B a continuación para composiciones de alrededor de 0,01 mg/ml a alrededor de 80 mg/ml y preferentemente de 5 a 60 mg/ml de plasminógeno o variante de este y con un pH de 6,5 a 8,0. En todos estos ejemplos, el contenido de plasminógeno se compone de más del 80% de Gluplasminógeno, y el contenido total de plasminógeno o variantes es de 5 mg/mL a 60 mg/mL. En la tabla 1B, las composiciones 1, 12, 23-30 no se ajustan a las reivindicaciones.

Tabla 1B			
N.º	Agente de carga:	Agente estabilizador	Modificador de tonicidad
1	-	-	NaCl 35 mM
2	-	HCl de arginina 25 mM	NaCl 35 mM
3	-	HCl de arginina 50 mM	NaCl 35 mM
4	Manitol 50 mM	HCl de arginina 25 mM	NaCl 35 mM
5	Manitol 50 mM	HCl de arginina 50 mM	NaCl 35 mM
6	Manitol 100 mM	HCl de arginina 25 mM	NaCl 35 mM
7	Manitol 100 mM	HCl de arginina 50 mM	NaCl 35 mM
8	Sorbitol 50 mM	HCl de arginina 25 mM	NaCl 35 mM
9	Sorbitol 50 mM	HCl de arginina 50 mM	NaCl 35 mM
10	Sorbitol 100 mM	HCl de arginina 25 mM	NaCl 35 mM
11	Sorbitol 100 mM	HCl de arginina 50 mM	NaCl 35 mM
12	-	-	NaCl 50 mM
13	-	HCl de arginina 25 mM	NaCl 50 mM
14	-	HCl de arginina 50 mM	NaCl 50 mM
15	Manitol 50 mM	HCl de arginina 25 mM	NaCl 50 mM
16	Manitol 50 mM	HCl de arginina 50 mM	NaCl 50 mM
17	Manitol 100 mM	HCl de arginina 25 mM	NaCl 50 mM
18	Manitol 100 mM	HCl de arginina 50 mM	NaCl 50 mM
19	Sorbitol 50 mM	HCl de arginina 25 mM	NaCl 50 mM
20	Sorbitol 50 mM	HCl de arginina 50 mM	NaCl 50 mM
21	Sorbitol 100 mM	HCl de arginina 25 mM	NaCl 50 mM
22	Sorbitol 100 mM	HCl de arginina 50 mM	NaCl 50 mM
23	-	HCl de arginina 25 mM	-
24	-	HCl de arginina 50 mM	-
25	-	HCl de arginina 75 mM	-
26	-	HCl de arginina 100 mM	-
27	-	HCl de arginina 25 mM	-
28	-	HCl de arginina 50 mM	-
29	-	HCl de arginina 75 mM	-
30	-	HCl de arginina 100 mM	-

En una realización, la composición farmacéutica que comprende el plasminógeno de la presente invención es adecuada para la administración intravenosa, subcutánea, tópica, intradérmica, oftálmica y/o intramuscular.

- 5 De acuerdo con una realización, la composición farmacéutica de la presente invención es para administrarse en un sujeto humano. Preferentemente, la composición farmacéutica de la presente invención es para la administración intravenosa, subcutánea, tópica, intramuscular u oftálmica. En una realización, la composición de la presente invención se encuentra en la forma de un líquido, gel, crema o ungüento.
- 10 El plasminógeno que se formula en la composición de la presente invención se puede obtener a partir de varias fuentes. Puede obtenerse por síntesis recombinante o extraerse/purificarse de la sangre, el plasma o una solución derivada de la sangre. El plasminógeno puede extraerse de la sangre o el plasma mediante fraccionamiento de Cohn o mediante precipitación. El plasminógeno puede purificarse a partir del plasma o una solución derivada de la sangre mediante cromatografía de afinidad de unión, tal como el método que se describe en WO 2006/120423.
- 15

Tal como se usa en la presente, el término "alrededor" pretende abarcar + o - 10 % del valor correspondiente.

El término "sujeto" incluye organismos vivientes que pueden beneficiarse de la administración de plasminógeno, una variante de este o un fragmento de este. El término "sujeto" incluye animales los cuales pueden ser mamíferos o aves. De preferencia, el sujeto es un mamífero. Más preferentemente, el sujeto es un humano. Aún más preferentemente, el sujeto es un paciente humano que necesita el tratamiento.

5

Tal como se utiliza en la presente, se tiene la intención de que "prevenir" o "prevención" se refiera a al menos la disminución de la probabilidad de riesgo de contraer (o la capacidad de ser susceptible a contraer) una enfermedad o trastorno (es decir, lograr que al menos uno de los síntomas clínicos no se desarrolle en un paciente que puede estar expuesto a la enfermedad o predispuesto a ella pero que aún no experimenta o no exterioriza síntomas de la enfermedad). Los parámetros biológicos y fisiológicos para identificar a tales pacientes se proporcionan en la presente y son también bien conocidos por los médicos.

10

Los términos "tratamiento" o "tratar" a un sujeto incluyen la aplicación o administración de una composición de la invención a un sujeto (o aplicación o administración de la composición de la invención a un tejido u órgano de un sujeto) con el objetivo de ralentizar, estabilizar, curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, frenar el agudizamiento, mejorar, beneficiar o afectar la enfermedad o afección, el síntoma de la enfermedad o afección o el riesgo de contraer (o la capacidad de ser susceptible a contraer) la enfermedad o afección. El término "tratar" hace referencia a cualquier indicación de éxito en el tratamiento o mejoría de una lesión, patología o afección, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como moderación, remisión o disminución de la tasa de agudización, disminución de la gravedad de la enfermedad; estabilización, disminución de los síntomas o hacer que las heridas, la patología o la afección sean más tolerables para el sujeto; ralentización de la tasa de degeneración o deterioro, hacer que la etapa final de degeneración sea menos debilitante, o mejorar el bienestar físico o mental de un sujeto. En algunas realizaciones, el término "tratar" puede incluir el aumento de la expectativa de vida de un sujeto y/o el retraso de tratamientos adicionales necesarios.

25

Tal como se usa en la presente, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de compuesto que, cuando se administra a un sujeto para el tratamiento o prevención de un trastorno, enfermedad o afección en particular, es suficiente para realizar tal tratamiento o prevención de ese trastorno, enfermedad o afección. Tal como se usa en la presente, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere además a la cantidad de plasminógeno, sus variantes o fragmentos que son eficaces para cicatrizar una herida, cicatrizar una perforación en la membrana del tímpano, cicatrizar una herida periodontal, tratar una enfermedad infecciosa, aumentar o mantener la salud oral, tratar el deterioro del vítreo posterior (PVD), úlcera diabética e indicaciones de trombólisis en sujetos con deficiencia de plasminógeno, tal como trombosis coronaria, tratar una lesión de tejido por reperfusión, tratar la isquemia, infarto, edema cerebral, para mejorar la microcirculación, tratar a sujetos con deficiencia de plasminógeno, y modular las vías complementarias en los sujetos. Las dosis y cantidades terapéuticamente eficaces pueden variar dependiendo, por ejemplo, de una variedad de factores, que incluyen la actividad de la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la alimentación del sujeto, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción y cualquier combinación de fármacos, si corresponde, el efecto que el médico desee que tenga el fármaco en el sujeto y el trastorno o trastornos particulares que padezca el sujeto. Además, la cantidad terapéuticamente eficaz puede depender de los parámetros sanguíneos del sujeto (por ejemplo, perfil lipídico, niveles de insulina, glicemia), la gravedad del estado de la enfermedad, el funcionamiento de los órganos o las enfermedades o complicaciones subyacentes. Tales dosis adecuadas pueden determinarse utilizando cualquier ensayo disponible incluso los ensayos descritos en la presente. Cuando la composición farmacéutica de la invención se administra a humanos, un médico puede, por ejemplo, recetar una dosis relativamente baja en un principio, aumentando posteriormente la dosis hasta obtener una respuesta adecuada. La dosis para administrar quedará, en última instancia, a criterio del médico.

30

35

40

45

Kits

50

El o los compuestos de la invención pueden ser empaquetados como parte de un kit, que incluye opcionalmente un recipiente (por ejemplo, paquete, una caja, un vial, etc.). El kit puede utilizarse de forma comercial de acuerdo con los métodos descritos en la presente y pueden incluir instrucciones de uso en un método de la invención.

55

La composición de la invención puede administrarse o no a un paciente en el mismo momento que otro ingrediente activo, antes o después, y por la misma vía de administración u otra vía de administración. Por lo tanto, la presente invención también comprende kits que, cuando son utilizados por el médico tratante, pueden simplificar la administración de cantidades apropiadas de la composición de la presente sola o en combinación con otro ingrediente activo a un paciente.

60

Los kits de la invención pueden comprender además un líquido farmacéuticamente aceptable para la reconstitución de una composición liofilizada. Por ejemplo, si se proporciona un ingrediente activo en una forma sólida que debe ser reconstituida para su administración parenteral, el kit puede comprender un recipiente cerrado herméticamente de un líquido farmacéuticamente aceptable adecuado en el cual el ingrediente activo puede disolverse para formar una solución estéril sin particulado que sea adecuada para la administración

65

parenteral.

En determinadas realizaciones, la composición de la presente se encuentra en un vial, botella tubo, jeringa u otro recipiente para administraciones únicas o múltiples. Dichos recipientes pueden estar elaborados de vidrio o un material polimérico tal como polipropileno, polietileno, cloruro de polivinilo o poliolefina, por ejemplo. En algunas realizaciones, los recipientes pueden incluir un sellado u otro sistema de cierre, tal como un tapón de goma que pueda penetrarse con una aguja para que libere una dosis única y luego vuelve a cerrarse al quitar la aguja. Se contemplan todos estos contenedores para líquidos inyectables, composiciones liofilizadas, composiciones liofilizadas reconstituidas o polvos para reconstitución e inyección conocidos en la técnica para su uso en los métodos y las composiciones descritas en la presente. En una realización particular, el recipiente es un aparato de liberación similar a un bolígrafo que comprende una dosis única o múltiples dosis. Dicho aparato de liberación similar a un bolígrafo puede ser permanente, por ejemplo, un bolígrafo permanente que aloja un cartucho descartable que contiene una única dosis o múltiples dosis, o el aparato completo puede ser desechable, por ejemplo, un bolígrafo desechable que contiene una única dosis o múltiples dosis. En determinadas realizaciones donde el aparato de liberación similar a un bolígrafo comprende múltiples dosis, la dosis puede establecerse previamente, es decir, fijarse. En otras realizaciones, la dosis puede ser una dosis flexible, es decir, marcada por el usuario. En algunas realizaciones, el aparato de liberación similar a un bolígrafo comprende un cierre luer, cono luer, u otro conector de ajuste de agujas que facilita la unión a una aguja desechable. En otras realizaciones, el aparato de liberación similar a un bolígrafo comprende una aguja apilada, es decir, permanente. En otra realización particular, el recipiente es una jeringa. En algunas realizaciones, la jeringa comprende un cierre luer, cono luer, u otro conector de ajuste de agujas que facilita la unión a una aguja desechable. En otras realizaciones, la jeringa comprende una aguja apilada, es decir, permanente. En algunas realizaciones, la jeringa se llena previamente con una única dosis o múltiple dosis.

25 Ensayos de estabilidad

Las composiciones "estables" incluyen composiciones en las cuales la proteína (plasminógeno o variante de este) en estas retienen esencialmente su estabilidad física y/o su estabilidad química y/o su actividad biológica una vez almacenada. Hay varias técnicas analíticas para medir la estabilidad de la proteína disponibles en la técnica y se revisan en Lee, V., 1991, Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301 (Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.) and Jones, A. 1993, Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90, por ejemplo. La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada para un período de tiempo seleccionado. En una realización, la composición es estable a temperatura ambiente (alrededor de 25 °C) o a 40 °C, durante al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses y/o estable a alrededor de 2-8°C durante al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. Además, en determinadas realizaciones, la composición es estable al congelarse (por ejemplo a -30 °C). En determinadas realizaciones, los criterios para determinar la estabilidad son los siguientes: (1) la composición permanece transparente mediante análisis visual; (2) la concentración, el pH y la osmolaridad de la composición no presenta un cambio mayor que alrededor de ±10 %; (3) no más de alrededor de 10 %, no más de alrededor de 5 %, o no más de alrededor de 1 % de las formas agregadas medidas por SEC-HPLC; y (4) no más de 10 %, no más de alrededor de 5 %, o no más de 3 % del plasminógeno se desintegra tal como se mide por métodos analíticos establecidos y conocidos en la técnica.

Desnaturalización térmica: La formulación para experimentos de desnaturalización térmica HTS que analizan el plasminógeno o variantes de este o fragmento de este se pueden realizar utilizando Optim 2™ de Pall; u otras técnicas biofísicas alternativas para controlar el desplegamiento de la proteína (PCR estándar (con bloqueo térmico), Fluorímetro o espectrofotómetro de CD (con control de temperatura). Como ejemplo, el sistema Optim 2 mide simultáneamente un intervalo de parámetros que indican la estabilidad de la proteína que incluyen la temperatura de transición de desplegamiento (T_m), temperatura de comienzo de agregación (Tagg) y velocidades de agregación.

Efectos de los excipientes sobre la termoestabilidad: El pH justo se determina en el intervalo de pH óptimo con mayor temperatura de fusión (T_m) y temperatura de comienzo de la agregación (Tagg). Si se obtiene la T_m mayor en el intervalo fisiológico de 6,5-7,5; la siguiente prueba es el análisis con al menos 3 sistemas de amortiguador.

De manera adicional, el IEF (enfoque isoeléctrico) o cIEF (enfoque isoeléctrico capilar) se puede estudiar para evaluar la conformación física del plasminógeno en solución.

El porcentaje de estabilización en función de las mediciones de la actividad enzimática del plasminógeno, para cada amortiguador/excipiente y para cada solución de referencia que contiene únicamente plasminógeno después de la incubación de 1-8 horas de incubación a 60°C. En otra prueba, la estabilización puede evaluarse la estabilización a 37 °C durante 1-8 horas. El porcentaje de estabilización se calcula como:

$$\text{Porcentaje de estabilización} = 100 \times [S - T] / [T]$$

Donde S es la actividad enzimática residual de la solución enzimática a ser evaluada después de 10 días a 35

°C; y T es la actividad de referencia sin ningún excipiente almacenado en las mismas condiciones.

Conteo de medición de partículas (PMC) y agregación El PMC se calcula mediante la prueba de conteo de conteo de partículas con oscurecimiento de la luz. El análisis debería utilizar un instrumento adecuado que se base en el principio del bloqueo de luz y que permita una determinación automática de la cantidad y tamaño de las partículas. El sensor seleccionado debe ser adecuado para el intervalo de tamaño de partícula preferido y el conteo de partículas anticipado. El intervalo de tamaño de partícula estándar es generalmente entre 2 y 100 µm. El análisis debería verificar el funcionamiento del aparato utilizando RS de conteo de partícula de USP dispersado en agua sin partículas en un volumen adecuado. Deben tomarse precauciones para evitar la aglomeración de partículas durante la dispersión en el proceso de calibración.

Métodos: Las muestras de producto se evalúan de manera que la mayoría represente la administración (por ejemplo, contenido de jeringa expulsado). Para dosis parenterales que tienen un volumen suficiente (es decir, volumen suficientemente grande para facilitar el estudio), el estudio de las unidades individuales es a menudo diagnóstico. Para los productos parenterales que no tienen volumen suficiente, mezcle bien cada unidad con cuidado, luego combine el contenido de una cantidad adecuada de unidades en un recipiente separado para obtener el volumen necesario para una única prueba (generalmente 0,2–5,0 mL). Si se realiza una dilución, asegúrese de que el recipiente vacío tenga volumen suficiente para el producto y los diluyentes y que se introduzcan pocas partículas, o ninguna, en el proceso. Abra cada unidad con precaución, quite el cierre de sellado y evite la contaminación del contenido antes de obtener las muestras, diluirlas, o, si es necesario, agruparlas. Cuando se especifica un solvente del producto, por ejemplo, para sólidos liofilizados o polvos para uso parenteral, la reconstitución o dilución debe llevarse a cabo con la cantidad adecuada de solvente específico. EN este caso, el solvente en sí mismo puede evaluarse para garantizar que no es una fuente significativa de partículas. La resta del conteo de partículas de solvente del conteo total no está permitida. Eliminar las burbujas de gas es una etapa clave, especialmente para los productos proteínicos que retienen gas fácilmente. Los métodos se recomiendan: ya sea permitiendo que el fluido de producto se asiente a presión ambiente o aplicando un vacío leve (por ejemplo, 75 Torr). Pueden utilizarse otros métodos cuando se demuestre que son adecuados. Debe evitarse la sonicación. Una vez que las muestras se hayan desgasificado, estas deben mezclarse de nuevo suavemente para suspender todas las partículas al mezclar el contenido de la muestra suavemente pero cuidadosamente por un medio adecuado, por ejemplo, remolino lento del recipiente con la mano. No se recomienda en ningún momento la inversión al mezclar el fluido del producto. Inmediatamente después del mezclado, retire las cuatro alícuotas de NLT, cada una de un volumen adecuado para la capacidad del instrumento (generalmente 0,2–5,0 mL). Cuente la cantidad de partículas sobre el intervalo de tamaño seleccionado, que incluye partículas iguales o mayores que 10 y 25 µm. Descarte el resultado obtenido para la primera alícuota, y calcule que la cantidad promedio de partículas en cada intervalo de tamaño para las alícuotas restantes de la preparación que se estudia. También se puede aplicar un volumen en tara para controlar el muestreo que debería ser representativo del intervalo dinámico del sensor y del volumen de la aguja.

Evaluación: Los requisitos de las autoridades reguladoras como la FDA (Administración de alimentos y fármacos) y USP/EP/JP (Farmacopea de los Estados Unidos) capítulos (787, 788 y 789), Farmacopea Europea EP (2.9.20 Contaminación en particulados) y Farmacopea japonesa JP (16: 6.06. 6.07 Prueba de material extraña insoluble) sobre Materia particulada definen el nivel aceptable de partículas en una preparación líquida para su uso en humanos como a continuación. Para productos parenterales que son inyecciones proteicas terapéuticas para infusión o inyección que se administran en recipientes con un contenido nominal menor que, o igual a, 100 mL: la cantidad promedio de partículas presentes en las unidades estudiadas no debería exceder las 6000 por recipiente igual a, o mayor que, 10 µm y no debería exceder las 600 por recipiente igual a, o mayor que, 25 µm. Para inyecciones proteicas terapéuticas que se administran en recipientes con un contenido nominal mayor que 100 mL, e inyecciones o preparaciones para infusión parenteral con un contenido nominal mayor que 100 mL: la cantidad promedio de partículas presentes en las unidades estudiadas no debería exceder 25 por mL igual a, o mayor que, 10 µm y no debería exceder 3 por mL igual a, o mayor que, 25 µm. Además, la carga total de partículas no debería exceder las 6000 por recipiente igual a, mayor que, 10 µm y no debería exceder las 600 por por recipiente igual a, mayor que, 25 µm. Los productos que se utilizan con un filtro final durante la administración (en línea) están exentos de estos requisitos, siempre que se encuentren disponibles datos científicos para justificar la exención. Sin embargo se espera que los filtrados cumplan con las reglas generales. Para productos que se administran o se reconstituyen en primer lugar en <100 mL, y luego se diluyen para infusión en un volumen >100 mL, el contenido de partículas debe evaluarse antes y después de la dilución y evaluarse en función de su volumen final. Por tanto, se incluye en la presente el método USP/EP/JP en este documento. En la presente, el término "partícula" hace referencia a "particulado" y viceversa; estos términos pueden utilizarse en forma intercambiable.

Estudio cinético medido mediante dispersión de luz a 476 nm / 600 nm utilizando Optim-2™ o mediante espectrofotómetro UV estándar a UV a 350 nm: Se seleccionan condiciones aceleradas, tales como temperatura elevada (65 °C) y pH de solución ácida (4,5) o pH de solución base (9,5) para evaluar más rápidamente los diferentes excipientes estabilizantes. Los componentes de la composición se evalúan para aumentar la Tagg en función del tiempo a una temperatura fija (55-60 °C) durante al menos 1 a 4 horas. El

comportamiento cinético de agregación de la solución de plasminógeno se mide a 55-60 °C equipado con control de temperatura (se determina la Tm del comienzo) durante hasta 4 h. Los excipientes se evalúan para determinar su efecto en la inhibición de la agregación de plasminógeno tal como se midió mediante la dispersión de luz a 267 nm, 467 nm o 350 nm (Cheng, W. et al. "Comparison of High-Throughput Biophysical Methods to Identify Stabilizing Excipients for a Model IgG2 Monoclonal Antibody: Conformational Stability and Kinetic Aggregation Measurements" Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 101, No 5, page 1701-1720, 2012).

El efecto de la concentración de proteínas de estabilidad térmica: Una de las ventajas de Optim-2™ o el Fluorímetro de barrido dual (DSF con la tinta Sypro) es la capacidad para llevar a cabo mediciones de Tm y Tagg en soluciones de proteínas altamente concentradas. Ya sea al investigar candidatos potenciales para determinar su estabilidad relativa o analizar las diferentes condiciones de formulación para la estabilidad de las proteínas, puede ser importante establecer las propiedades de la solución de proteínas en concentraciones altas donde la cantidad de métodos de caracterización disponibles es limitada.

Efecto de la formulación de la composición sobre la osmolaridad final: En la composición farmacéutica final, no se prefiere que las concentraciones de amortiguador, excipiente y sal sean muy altas debido a las limitaciones prácticas de la inyección parental. En su lugar, se prefieren las concentraciones más moderadas tales como más fisiológicas con el fin de obtener una osmolaridad en el intervalo de 240 a 400 mOsm. Por lo tanto, la osmolaridad se calcula para determinar inicialmente este intervalo; sin embargo, para la inyección IV también se pueden utilizar concentraciones de osmolaridad más elevadas durante el desarrollo del proceso de secado por congelamiento, si, después de la reconstitución, el plasminógeno o variante o fragmento de este se diluye mediante la solución para su reconstitución.

Debe observarse que el término "Formulación" y "Composición" se pueden utilizar en la presente de manera alternativa y se pretende que designen lo mismo.

Las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural correspondientes a menos que el contexto claramente lo indique de otra manera.

Salvo que se indique lo contrario, se debe comprender que todas las cifras que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, concentraciones, propiedades y otras utilizadas en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se encuentran modificadas en todos los casos por el término "alrededor de". Como mínimo, cada parámetro numérico debería al menos ser interpretado según la cantidad de dígitos significativos reportados y aplicando técnicas comunes de redondeo. Por lo tanto, salvo que se indique lo contrario, los parámetros numéricos que se indican en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busque obtener. Sin perjuicio de que los intervalos y los parámetros numéricos que indican el amplio alcance de las realizaciones sean aproximaciones, los valores numéricos que se indican en los ejemplos específicos se indican de la forma más precisa posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene inherentemente ciertos errores que resultan de variaciones en experimentos, mediciones de pruebas, análisis estadísticos y demás.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la práctica de esta invención pero no se pretende que la limiten.

Los ejemplos según las reivindicaciones son los que comprenden:

- Glu-plasminógeno en una concentración comprendida entre aproximadamente 0,01 mg/ml y aproximadamente 80 mg/ml;

- cloruro sódico presente en una concentración comprendida entre unos 30 mM y unos 100 mM; y

- arginina o glicina, en una concentración de entre unos 10 mM y unos 100 mM;

en donde la composición tiene un pH comprendido entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0; y

en donde la osmolalidad de la composición está comprendida entre unos 180 mOsm y unos 350 mOsm.

Ejemplo 1: Estabilidad del plasminógeno en una formulación congelada

Los resultados del análisis de estabilidad para una composición farmacéutica que comprende 5 mg/ml de plasminógeno humano extraído del plasma de acuerdo con una técnica de afinidad de unión descrita en WO 2006/120423, Citrato 10 mM, NaCl 150 mM, a pH 6,5 (Lote: 2002.pc02_Pg140210.01) se almacenaron a -20 °C, -30 °C y -80 °C durante hasta 6 meses. Los datos de estabilidad indicaron que el plasminógeno es

estable en estas condiciones de congelamiento. El lote de plasminógeno: 2002.pc02_Pg140210.01 se estudió a -20 °C, -30 °C y -80 °C. El nivel de agregación se investigó mediante SEC-HPLC, el nivel de pureza mediante SDS-PAGE con condiciones de reducción, y de no reducción, el nivel de actividad mediante actividad de BCS y la concentración de proteínas mediante absorbancia a 280 nm (ABS₂₈₀). Los resultados de los datos de estabilidad después de 6 meses demostraron que todos los ensayos que demostraron la estabilidad lograron las especificaciones deseadas.

Ejemplo 2: Análisis de osmolaridad y porcentaje total de análisis de sólidos

10 La osmolaridad de las formulaciones 1 a 6 y el porcentaje total de sólidos después de la liofilización para las formulaciones 1-9 se indican en la Tabla 2. El contenido de las Formulaciones 1-9 se define en la Tabla 1A.

Tabla 2

Formulación	Plasminógeno	Sacarosa	Glicina	NaCl	% total de torta sólida	Osmolaridad
N.º	mg/mL	mM	mM	mM	%	mOsm
1	5	73	67	68	3,9	265
2	5	73	34	34	3,4	198
3	5	117	67	68	5,4	309
4	5	117	67	34	5,2	275
5	5	73	67	34	3,7	231
6	5	73	67	75	3,9	272
7	5	27	40	75	3,9	TBD
8	5	26,5	47	75	3,9	TBD
9	5	26	54	75	3,9	TBD

15 La osmolaridad se encuentra en el intervalo fisiológico de 240-400 mOsm. La osmolaridad resultante de las composiciones estudiadas se encuentra de manera ventajosa dentro del intervalo fisiológico de osmolaridad o muy cerca de este. El % total de la torta sólida (g de composición sólida después de la liofilización cada 100 ml de la composición líquida antes de la liofilización) se encuentra alrededor de 4 % para todas las composiciones y placebos, que se encuentra a del intervalo preferido de 3,5 to 8 %.

20 Ejemplo 3: Peso molecular del plasminógeno

El peso molecular del plasminógeno purificado y formulado en la composición farmacéutica de la presente invención tiene un peso molecular de 87.000 (MW), que se determinó mediante el cálculo de la secuencia de aminoácidos primaria del plasminógeno y se verificó mediante espectrometría de masas.

Ejemplo 4: Estudio de la apariencia de la torta después de la liofilización

30 Las formulaciones 1 a 5 se han liofilizado siguiendo el proceso cíclico que se detalla en la Tabla 5. El contenido de las Formulaciones 1-5 se define en la Tabla 1A.

Tabla 5

Etapa	Punto de referencia de temperatura de vida útil, [°C]	Tiempo de rampa [minutos]	Tiempo de remojo [minutos]	Punto de referencia de presión, [mT]
Carga de producto	5	-	60	Atmosférica
Congelamiento	-50	120	240	Atmosférica
Evacuación	-50	-	-	50
Principales	-22	90	3860	50
Secundarios	35	120	270	50

35 Las Figuras 2 a 11 son fotografías de los viales que contienen 12,5 ml de las formulaciones 1 a 5 respectivamente, o su placebo correspondiente (sin plasminógeno). Por lo tanto, se ha investigado el efecto de la presencia de plasminógeno en la estabilidad de la composición. La inspección física de la apariencia de la torta que se ha formado mediante el proceso de liofilización. Todas las tortas han mantenido una densidad uniforme, sin ninguna decoloración. Menos de 10 % de los viales evaluados para observar el placebo de las formulaciones 2, 3 y 5 ha proporcionado una fusión. Menos de 10 % de los viales evaluados para observar el placebo de la formulación 1 ha colapsado. Menos de 10 % de los viales evaluados para las formulaciones 1-5 y el placebo de la formulación 4 ha mostrado una retracción basal. En general, la apariencia de la torta es satisfactoria.

ES 2 988 173 T3

El contenido de la composición indica temperatura de colapso. Cada excipiente amorfo puro tiene una temperatura de colapso y Tg' características; la temperatura de colapso para la formulación son las temperaturas promedio de la masa de todas las composiciones en la fase amorfa. Es importante producir una formulación con temperatura de colapso máxima, debido a que la velocidad de secado es directamente proporcional a la temperatura de la muestra durante la liofilización.

Finalmente, la temperatura de colapso disminuirá si las sales (NaCl) y los excipientes no se cristalizan al máximo. Por ejemplo, la glicina tiene una Tg' de -45 °C, y su contribución a la fase amorfa puede reducir la temperatura de colapso a valores bajos poco prácticos.

Ejemplo 5: Efecto de los aminoácidos sobre la agregación de plasminógeno en solución

El plasminógeno solo en agua genera una cantidad de agregados de plasminógeno que no es aceptable por la FDA, es decir, mayor que 6000 partículas de 10 µm o mayor cada 100 mL de composición (ver la Muestra F0406 en la Tabla 6). Varias formulaciones a base de sacarosa se han desarrollado para formular plasminógenos. Aunque la mayoría de estas formulaciones logran cumplir el umbral de 6000 partículas de 10 µm o mayor cada 100 mL, se han desarrollado formulaciones que contienen un menor contenido de partículas y en la presente se estudia el efecto de los aminoácidos para estabilizar el plasminógeno. Estas formulaciones adicionales contienen 10 mg de plasminógeno y NaCl 35 mM, y se han evaluado tres amortiguadores/pH, es decir, citrato de sodio 10 mM (pH 6,5), fosfato de sodio 10 mM (pH 7,2) y Tris HCL 10 mM (pH 8,0). Se comparó la presencia y ausencia de un aminoácido que se selecciona de arginina, alanina y glicina a una concentración de 0,5 %. Estas formulaciones son nuevas, es decir, antes de la liofilización. La Tabla 6 informa sobre el conteo PMC para las partículas de 10 µm o más y de 25 µm o más. La presencia de aminoácidos ha demostrado que un efecto estabilizante ha contribuido a reducir el nivel de agregación.

Tabla 6

Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	Pre-lio Conteo de PMC/mL	
		10 µm	25 µm
F0406	Volumen de Pg en agua a 10 mg/ml	1.039.061	20.181
Rx1	Pg (5 mg/mL), glicina 67 mM	5.793	155
Rx5	Pg (5 mg/mL), amortiguador de citrato 12 mM, sacarosa 73 mM, NaCl 68 mM, glicina 67 mM, pH 6,5	5.495	243
Rx6	Pg (5 mg/mL), amortiguador de citrato 12 mM, sacarosa 117 mM, NaCl 68 mM, pH 6,5	4.068	94
Rx7	Pg (5 mg/mL), amortiguador de citrato 12 mM, sacarosa 117 mM, NaCl 68 mM, pH 6,5	3.349	96
F0080	Pg (10mg/mL), Citrato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5	147	0
F0081	Pg (10mg/mL), Citrato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, glicina 66 mM (0,5 %), pH 6,5	109	0
F0082	Pg (10 mg/mL), Citrato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), pH 6,5	122	1
F0083	Pg (10mg/mL), Citrato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, alanina 26 mM (0,5 %), pH 6,5	91	1
F0102	Pg (10 mg/mL), fosfato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2	271	18
F0103	Pg (10 mg/mL), fosfato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, glicina 66 mM (0,5 %), pH 7,2	124	6

ES 2 988 173 T3

Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	Pre-lío Conteo de PMC/mL	
		10 µM	25 µm
F0104	Pg (10 mg/mL), fosfato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), pH 7,2	128	3
F0105	Pg (10 mg/mL), fosfato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, alanina 26 mM (0,5 %), pH 7,2	180	2
F0106	Pg (10 mg/mL), Tris 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0	118	5
F0107	Pg (10 mg/mL), Tris 10 mM, NaCl 35 mM, glicina 66 mM (0,5 %), pH 8,0	91	7
F0108	Pg (10 mg/mL), Tris 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), pH 8,0	75	3
F0109	Pg (10 mg/mL), Tris 10 mM, NaCl 35 mM, alanina 26 mM (0,5 %), pH 8,0	46	1

Ejemplo 6: Efecto de manitol combinado con aminoácido sobre la agregación de plasminógeno

- 5 Se ha evaluado la presencia del agente espesante manitol al 0,5 %, en las formulaciones que contienen 10 mg de plasminógeno y NaCl 35 mM, con citrato de sodio 10 mM (pH 6,5), fosfato de sodio 10 mM (pH 7,2) o Tris HCL 10 mM (pH 8,0), con y sin aminoácido (clorhidrato de arginina al 0,5 %, alanina o glicina) y se indica en la Tabla 7. En este estudio se evaluaron formulaciones nuevas (antes de la liofilización). Generalmente, la presencia de manitol ha disminuido el conteo de partículas. Generalmente, la combinación de manitol y aminoácido contribuye a bajar los conteos de partículas, y especialmente con la combinación de arginina con manitol.
- 10

Tabla 7

Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	Pre-lío Conteo de PMC/mL	
		10 µM	25 µm
F0114	Pg (9 mg/mL), citrato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5	3.610	61
F0115	Pg (9 mg/mL), Citrato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, manitol 27 mM (0,5 %), pH 6,5	805	8
F0116	Pg (9 mg/mL), Citrato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, glicina 66 mM (0,5 %), manitol 27 mM (0,5 %), pH 6,5	962	13
F0117	Pg (9 mg/mL), Citrato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 27 mM (0,5 %), pH 6,5	520	11
F0118	Pg (9 mg/mL), Citrato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, alanina 26 mM (0,5 %), manitol 27 mM (0,5 %), pH 6,5	990	1
F0119	Pg (9 mg/mL), fosfato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2	133	6
F0120	Pg (9 mg/mL), fosfato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, manitol 27 mM (0,5 %), pH 7,2	107	3
F0121	Pg (9 mg/mL), fosfato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, glicina 66 mM (0,5 %), manitol 27 mM (0,5 %), pH 7,2	191	6
F0122	Pg (9 mg/mL), fosfato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 27 mM (0,5 %), pH 7,2	95	2

ES 2 988 173 T3

Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	Pre-lio Conteo de PMC/mL	
		10 µM	25 µm
F0123	Pg (9 mg/mL), fosfato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, alanina 26 mM (0,5 %), manitol 27 mM (0,5 %), pH 7,2	113	5
F0124	Pg (9 mg/mL), Tris 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0	86	2
F0125	Pg (9 mg/mL), Tris 10 mM, NaCl 35 mM, manitol 27 mM (0,5 %), pH 8,0	578	10
F0126	Pg (9 mg/mL), Tris 10 mM, NaCl 35 mM, Glicina 66 mM (0,5 %), manitol 27 mM (0,5 %), pH 8,0	163	5
F0127	Pg (9 mg/mL), tris 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 27 mM (0,5 %), pH 8,0	13	3
F0128	Pg (9 mg/mL), Tris 10 mM, NaCl 35 mM, alanina 26 mM (0,5 %), manitol 27 mM (0,5 %), pH 8,0	119	8

Ejemplo 7: Efecto del conservante en la agregación de plasminógeno

5 Se ha evaluado la presencia del conservante, tal como fenol al 0,1 %, en las formulaciones que contienen 9 o 10 mg de plasminógeno y NaCl 35 mM, con citrato de sodio 10 mM (pH 6,5), fosfato de sodio 10 mM (pH 7,2) o Tris HCL 10 mM (pH 8,0), con clorhidrato de arginina al 0,5 %, o la combinación de clorhidrato de arginina al 0,5 % y manitol al 0,5 %. En este estudio de evaluaron formulaciones nuevas (antes de la liofilización). Los conteos de materia particulada (PMC) se indican en la Tabla 8. De manera ventajosa, la presencia de fenol no ha afectado significativamente los conteos de partículas.

10

Tabla 8

Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	Pre-lio PMC Conteo/mL	
		10 µM	25 µm
F0114	Pg (9 mg/mL), citrato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5	3.610	61
F0143	Pg (10 mg/mL), Citrato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), pH 6,5	609	8
F0144	Pg (10 mg/mL), Citrato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), fenol al 0,1 %, pH 6,5	3.191	27
F0145	Pg (10 mg/mL), Citrato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 27 mM (0,5 %), fenol al 0,1 %, pH 6,5	1.538	9
F0155	Pg (10 mg/mL), fosfato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), pH 7,2	1.097	7
F0156	Pg (10 mg/mL), fosfato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), fenol al 0,1 %, pH 7,2	4.370	6
F0157	Pg (10 mg/mL), fosfato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 27 mM (0,5 %), fenol al 0,1 %, pH 7,2	747	9
F0158	Pg (10 mg/mL), Tris 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), pH 8,0	169	4
F0159	Pg (10 mg/mL), Tris 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), fenol al 0,1 %, pH 8,0	168	3

ES 2 988 173 T3

F0160	Pg (10 mg/mL), Tris 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 27 mM (0,5 %), fenol al 0,1 %, pH 8,0	175	1
-------	--	-----	---

5 Se compararon varios conservantes. La Tabla 9 indica una comparación de CMC al 0,5 %, fenol al 0,1 % y dextrano al 0,5 % dentro de las formaciones de las formulaciones que contienen 10 mg de plasminógeno y NaCl 35 mM, con citrato de sodio 10 mM (pH 6,5), fosfato de sodio 10 mM (pH 7,2) o Tris HCL 10 mM (pH 8,0), y clorhidrato de arginina al 0,5 %. En este estudio se evaluaron formulaciones nuevas (antes de la liofilización). La presencia de dextrano o fenol no ha afectado significativamente la agregación. Sin embargo, CMC ha aumentado significativamente la agregación. Esto no sorprende ya que se sabe que la CMC aumenta la viscosidad de una solución y se utiliza frecuentemente en la preparación de formulaciones de gotas para los

10

Tabla 9

Identificación de la muestra	Descripción de la muestra	Pre-lio Conteo de PMC/mL	
		10 µM	25 µM
F0119	Pg (9 mg/mL), fosfato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2	133	6
F0569	Volumen de Pg (10 mg/mL) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), pH 7,2, filtrado (F0199), F/T=1x	19	1
F0570	Pg (10 mg/mL), fosfato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), CMC al 0,5 %, pH 7,2	7.783	1
F0571	Pg (10 mg/mL), fosfato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), fenol al 0,1 %, pH 7,2	25	1
F0572	Pg (10 mg/mL), fosfato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), dextrano al 0,5 %, pH 7,2	37	1

Ejemplo 8: Efecto del aminoácido y su concentración en la agregación de plasminógeno

15 Se evaluaron la arginina a 0,5 % y 1 % en formulaciones de plasminógeno 10 mg/mL, NaCl 35 mM, fosfato de sodio 10 mM (NaPi), pH 7,2, después de la liofilización y la reconstitución. Los conteos de partículas (PMC) se indican en la Tabla 10, que muestran que ambas concentraciones de arginina son muy buenas para mantener un valor de PMC bajo.

20 Tabla 10

Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	Reconstitución en dH ₂ O (ml)	Volumen (ml)	Conteo de PMC/mL Pre-lio	
				10 µM	25 µM
F0211	Pg 10mg/mL, Arg 28 mM (0,5 %), NaCl 35 mM, NaPi 10 mM, pH 7,2	12,5	4	87	2
F0213	Pg 10mg/mL, Arg 57 mM (1 %), NaCl 35 mM, NaPi 10 mM, pH 7,2	12,5	4	124	11

La arginina glicina y alanina al 1 % se compararon en formulaciones de plasminógeno 10 mg/mL, NaCl 35 mM, fosfato de sodio 10 mM (NaPi), pH 7,2, después de la liofilización y la reconstitución. Los conteos de partículas (PMC) se muestran en la Tabla 11, que muestra que la arginina es mejor que la alanina y la glicina para

ES 2 988 173 T3

mantener un valor de PMC bajo en las condiciones estudiadas, aunque estos tres aminoácidos proporcionan valores de PMC aceptables, es decir, por debajo de las 6000 partículas igual a, o mayor que, 10 µm cada 100 mL.

5 Tabla 11

Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	Reconstitución en dH ₂ O (ml)	Volumen (ml)	Pre-lío PMC Conteo/mL	
				10 µm	25 µm
F0215	Pg 10mg/mL, Arg 57 mM (1 %), NaCl 35 mM, NaPi 10 mM, pH 7,2	12,5	4	178	6
F0217	Pg 10mg/mL, Gly 57 mM (1 %), NaCl 35 mM, NaPi 10 mM, pH 7,2	12,5	4	881	5
F0219	Pg 10mg/mL, Ala 57 mM (1 %), NaCl 35 mM, NaPi 10 mM, pH 7,2	12,5	4	5.713	9

Ejemplo 9: Porcentaje total de sólido y osmolaridad

- 10 La osmolaridad de diversas formulaciones de 10 mg/mL de plasminógeno y el porcentaje de materia sólida utilizada para preparar dichas formulaciones se indican en la Tabla 12. La osmolaridad de diversas formulaciones de 20 mg/mL de plasminógeno y el porcentaje de materia sólida utilizada para preparar dichas formulaciones se indican en la Tabla 13. La osmolaridad resultante de las formulaciones estudiadas se encuentra de manera ventajosa dentro del intervalo fisiológico de osmolaridad o muy cerca de este. El porcentaje total de la materia sólida se calcula a partir del contenido de plasminógeno, modificador de tonicidad y agente espesante de este y es un buen indicador del tamaño de la torta resultante después de la liofilización.
- 15

Tabla 12

Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	% total de sólido	mOsm/kg H ₂ O
Control	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5	1,0%	104
F0468	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %)	1,5	157
F0469	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 54 mM (1 %)	2,5	209
F0470	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 108 mM (2 %)	3,5	377
F0471	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 54 mM (1 %)	2,5	205
F0472	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 108 mM (2 %)	3,5	298
F0473	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1 %)	2,0	204
F0474	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1 %), manitol 54 mM (1 %)	3,0	263
F0475	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1 %), manitol 108 mM (2 %)	4,0	325
F0476	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1 %), sorbitol 54 mM (1 %)	3,0	252
F0477	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1 %), sorbitol 108 mM (2 %)	4,0	294
Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	% total de sólido	mOsm/kg H ₂ O
Control	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2	1,0%	106
F0448	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %)	1,5	155

ES 2 988 173 T3

F0449	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 54 mM (1 %)	2,5	248
F0450	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 108 mM (2 %)	3,5	345
F0451	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 54 mM (1 %)	2,5	235
F0452	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 108 mM (2 %)	3,5	374
F0453	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1 %)	2,0	283
F0454	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1 %), manitol 54 mM (1 %)	3,0	304
F0455	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1 %), manitol 108 mM (2 %)	4,0	255
F0456	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1 %), sorbitol 54 mM (1 %)	3,0	277
F0457	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1 %), sorbitol 108 mM (2 %)	4,0	284
Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	% total de sólido	mOsm/kg H ₂ O
Control	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0	1,00%	86
F0488	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %)	1,5	144
F0489	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 54 mM (1 %)	2,5	176
F0490	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 108 mM (2 %)	3,5	324
F0491	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 54 mM (1 %)	2,5	200
F0492	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 108 mM (2 %)	3,5	199
F0493	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1 %)	2,0	186
F0494	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1 %), manitol 54 mM (1 %)	3,0	248
F0495	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1 %), manitol 108 mM (2 %)	4,0	277
F0496	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1 %), sorbitol 54 mM (1 %)	3,0	239
Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	% total de sólido	mOsm/kg H ₂ O
F0497	P2146 volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1 %), sorbitol 108 mM (2 %)	4,0	290

Tabla 13

Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	% total de sólido	mOsm/kg H ₂ O
Control	Volumen de Pg (20 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5	2,0%	112
F0478	Volumen de Pg (20 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %)	2,5	170
F0479	Volumen de Pg (20 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 54 mM (1 %)	3,5	245
F0480	Volumen de Pg (20 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 108 mM (2 %)	4,5	307
F0481	Volumen de Pg (20 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 54 mM (1 %)	3,5	255

ES 2 988 173 T3

F0482	Volumen de Pg (20 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 108 mM (2 %)	4,5	306
F0483	Volumen de Pg (20 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1 %)	3,0	243
F0484	Volumen de Pg (20 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1 %), manitol 54 mM (1 %)	4,0	264
F0485	Volumen de Pg (20 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1 %), manitol 108 mM (2 %)	5,0	341
F0486	Volumen de Pg (20 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1 %), sorbitol 54 mM (1 %)	4,0	337
F0487	Volumen de Pg (20 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1 %), sorbitol 108 mM (2 %)	5,0	370
Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	% total de sólido	mOsm/kg H ₂ O
Control	P24129 volumen de Pg (20 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2	2,0%	113
F0458	Volumen de Pg (20 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %)	2,5	200
F0459	Volumen de Pg (20 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 54 mM (1 %)	3,5	265
F0460	Volumen de Pg (20 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 108 mM (2 %)	4,5	293
F0461	Volumen de Pg (20 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 54 mM (1 %)	3,5	279
Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	% total de sólido	mOsm/kg H ₂ O
F0462	Volumen de Pg (20 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 108 mM (2 %)	4,5	310
F0463	Volumen de Pg (20 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1 %)	3,0	259
F0464	Volumen de Pg (20 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1 %), manitol 54 mM (1 %)	4,0	350
F0465	Volumen de Pg (20 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1 %), manitol 108 mM (2 %)	5,0	412
F0466	Volumen de Pg (20 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1 %), sorbitol 54 mM (1 %)	4,0	366
F0467	Volumen de Pg (20 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1 %), sorbitol 108 mM (2 %)	5,0	419
Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	% total de sólido	mOsm/kg H ₂ O
Control	Volumen de Pg (20 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0	2,0%	89
F0498	Volumen de Pg (20 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %)	2,5	201
F0499	Volumen de Pg (20 mg/ml) en Tris-HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 54 mM (1 %)	3,5	260
F0500	Volumen de Pg (20 mg/ml) en Tris-HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 108 mM (2 %)	4,5	313
F0501	Volumen de Pg (20 mg/ml) en Tris-HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 54 mM (1 %)	3,5	200

ES 2 988 173 T3

F0502	Volumen de Pg (20mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 108 mM (2 %)	4,5	319
F0503	Volumen de Pg (20mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1 %)	3,0	246
F0504	Volumen de Pg (20mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1 %), manitol 54 mM (1 %)	4,0	314
F0505	Volumen de Pg (20mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1 %), manitol 108 mM (2 %)	5,0	310
F0506	Volumen de Pg (20mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1 %), sorbitol 54 mM (1 %)	4,0	282
F0507	Volumen de Pg (20mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1%), sorbitol 108 mM (2 %)	5,0	279

Ejemplo 10: Conteos de partículas (PMC)

- 5 Los conteos de partículas (PMC) para las partículas iguales a, o mayores que, 10 µm de las formulaciones que se describen en la Tabla 12 se indican en la Tabla 14; y los conteos de partículas (PMC) para las partículas iguales a, o mayores que, 10 µm de las formulaciones que se describen en la Tabla 13 se indican en la Tabla 15.

Tabla 14

Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	Conteo de PMC/mL Pre-lío 10 µm	Conteo de PMC/mL Lío-Recon 10 µm
Control	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5	379	389
F0468	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %)	35	224
F0469	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 54 mM (1 %)	37	136
F0470	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 108 mM (2 %)	33	152
F0471	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 54 mM (1 %)	21	159
F0472	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 108 mM (2 %)	94	258
F0473	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1 %)	45	342
F0474	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1%), manitol 54 mM (1 %)	61	218
F0475	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1%), manitol 108 mM (2%)	129	138
F0476	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1%), sorbitol 54 mM (1 %)	112	401
F0477	Volumen de Pg (10 mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1%), sorbitol 108 mM (2%)	155	159
Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	Conteo de PMC/mL Pre-lío 10 µm	Conteo de PMC/mL Lío-Recon 10 µm
Control	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2	2.400	3.819
F0448	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %)	135	198
F0449	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 54 mM (1 %)	171	104
F0450	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 108 mM (2 %)	267	254
F0451	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 54 mM (1 %)	122	133
Identificación	Descripción de la muestra	Conteo de	Conteo de

ES 2 988 173 T3

asignada a la muestra		PMC/mL Pre-lío 10 µm	PMC/mL Lío-Recon 10 µm
F0452	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 108 mM (2 %)	214	176
F0453	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1%)	37	262
F0454	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1%), manitol 54 mM (1 %)	63	84
F0455	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1%), manitol 108 mM (2 %)	109	150
F0456	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1%), sorbitol 54 mM (1 %)	86	169
F0457	Volumen de Pg (10 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1%), sorbitol 108 mM (2 %)	85	229
Control	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0	3.341	4.007
F0488	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %)	150	414
F0489	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 54 mM (1 %)	151	387
F0490	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 108 mM (2 %)	91	528
F0491	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 54 mM (1 %)	240	589
F0492	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 108 mM (2 %)	120	507
F0493	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1%)	103	229
F0494	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1%), manitol 54 mM (1 %)	90	507
F0495	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1%), manitol 108 mM (2 %)	67	256
F0496	Volumen de Pg (10 mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1%), sorbitol 54 mM (1 %)	131	375
F0497	Volumen de Pg (10mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1%), sorbitol 108 mM (2 %)	62	456

Tabla 15

Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	Conteo PMC/mL Pre-Lío 10 µm	Conteo PMC/mL Lío-Recon 10µm
Control	Volumen de Pg (20mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5	1100	793
F0478	Volumen de Pg (20mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %)	171	358
F0479	Volumen de Pg (20mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 54 mM (1 %)	118	572
F0480	Volumen de Pg (20mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 108 mM (2 %)	132	515
F0481	Volumen de Pg (20mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 54 mM (1 %)	96	427
F0482	Volumen de Pg (20mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 108 mM (2 %)	101	585
F0483	Volumen de Pg (20mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1%)	132	286
F0484	Volumen de Pg (20mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1%), manitol 54 mM (1 %)	115	537
F0485	Volumen de Pg (20mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1%), manitol 108 mM (2 %)	154	362
F0486	Volumen de Pg (20mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1%), sorbitol 54 mM (1 %)	114	535
F0487	Volumen de Pg (20mg/ml) en citrato de Na 10 mM, NaCl 35	194	384

ES 2 988 173 T3

Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	Conteo PMC/mL Pre-Lio 10 µm	Conteo PMC/mL Lio-Recon 10µm
	mM, pH 6,5, arginina 57 mM (1 %), sorbitol 108 mM (2 %)		
Control	Volumen de Pg (20 mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2	3.784	2.619
F0458	Volumen de Pg (20mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %)	75	398
F0459	Volumen de Pg (20mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 54 mM (1 %)	96	193
F0460	Volumen de Pg (20mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5%), manitol 108 mM (2 %)	128	198
F0461	Volumen de Pg (20mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 54 mM (1 %)	123	659
Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	Conteo PMC/mL Pre-Lio 10 µm	Conteo PMC/mL Lio-Recon 10µm
F0462	Volumen de Pg (20mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 28,5 mM (0,5%), sorbitol 108 mM (2 %)	103	317
F0463	Volumen de Pg (20mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1%)	93	270
F0464	Volumen de Pg (20mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1%), manitol 54 mM (1 %)	99	386
F0465	Volumen de Pg (20mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1 %), manitol 108 mM (2 %)	139	172
F0466	Volumen de Pg (20mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1 %), sorbitol 54 mM (1 %)	67	681
F0467	Volumen de Pg (20mg/ml) en fosfato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 7,2, arginina 57 mM (1 %), sorbitol 108 mM (2 %)	93	261
Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	Conteo PMC/mL Pre-Lio 10 µm	Conteo PMC/mL Lio-Recon 10µm
Control	Volumen de Pg (20mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0	6.315	7.123
F0498	Volumen de Pg (20mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %)	629	3.382
F0499	Volumen de Pg (20 mg/ml) en Tris-HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 54 mM (1 %)	1329	1.596
F0500	Volumen de Pg (20 mg/ml) en Tris-HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %), manitol 108 mM (2 %)	1007	896
F0501	Volumen de Pg (20 mg/ml) en Tris-HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 54 mM (1 %)	649	1.401
F0502	Volumen de Pg (20mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 28,5 mM (0,5 %), sorbitol 108 mM (2 %)	793	684
F0503	Volumen de Pg (20mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1 %)	459	703
F0504	Volumen de Pg (20mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1%), manitol 54 mM (1 %)	505	608
F0505	P2147 volumen de Pg (20mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1%), manitol 108 mM (2 %)	155	382
F0506	Volumen de Pg (20mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1%), sorbitol 54 mM (1 %)	213	898
Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	Conteo PMC/mL Pre-Lio 10 µm	Conteo PMC/mL Lio-Recon 10µm
F0507	Volumen de Pg (20mg/ml) en Tris HCl 10 mM, NaCl 35 mM, pH 8,0, arginina 57 mM (1%), sorbitol 108 mM (2 %)	101	431

Las imágenes de los viales se muestran en las Figuras 12, 13 y 14, que contienen formulaciones F0498, F0449 y F0459, respectivamente, como ejemplos representativos de la aparición de las formulaciones liofilizadas

sobre las que se informa en las Tablas 12-15.

Ejemplo 10: Agregación de plasminógeno reversible

5 La agregación de plasminógeno es reversible tal como se demostró en este estudio. Las muestras de plasminógeno congeladas (volumen de Pg) de 5 mg/ml, se dializaron en dH₂O y se precipitaron rápidamente, se descongelaron, se filtraron a través de un filtro de jeringa de 1,2 µm, y se utilizaron como material de partida para control (control de Pg). Se agregaron alícuotas de 2 ml de Pg de control a viales de vidrio, inyectados
10 previamente con soluciones madre de amortiguador de citrato de Na 1 M pH 6,5 (Muestra 1), fosfato de Na 0,5 M, pH 7,2 (Muestra 2) o Tris-HCl 1 M, pH 8,0 (Muestra 3) para obtener una concentración final de amortiguador de 10 mM para cada pH, respectivamente. Las muestras 1, 2 y 3 se muestran en la Figura 15, donde el control no inyectado es la Muestra 0. Las muestras 1, 2 y 3 se inyectaron adicionalmente con soluciones madre de NaCl 5 M y Arginina 0,8 M para obtener una concentración final de NaCl 35 mM y Arg 28,5 mM (0,5 %) en cada muestra y se muestran en la Figura 16. Los estándares de turbidez de 0,02, 20, 100, 800 NTU respectivamente,
15 se utilizaron en las Figuras 15 y 16, como referencia. Puede observarse de la Figura 15 que el ajuste de pH ha disuelto una cantidad considerable de agregados. En la Figura 16, las Muestra 1, 2 y 3 se vuelven transparentes por la adición de Arginina y NaCl y no se puede detectar ningún agregado visualmente.

20 La turbidez de las Muestras 0, 1, 2 y 3 de la Figura 16 se midieron mediante la lectura de la densidad óptica (OD) a 550 nm utilizando calibración estándar con estándares de referencia de turbidez que se muestran en las Figuras 15 y 16. La turbidez se indica en Unidades de Turbidez Nefelométricas (NTU) en la Tabla 16. Se midieron alícuotas de 1 ml de cada muestra antes (T=0) y después de inyectar las muestras 1, 2 y 3 con amortiguador, NaCl y Arginina a 0,1 hora, 17 horas 21 horas y 24 horas. La desagregación es rápida y se puede percibir a solo 0,1 hora después de la inyección, y se mantiene durante 24 horas.

25

Tabla 16

Identificación asignada a la muestra	Descripción de la muestra	Turbidez (NTU por OD 550)				
		T=0	T=0,1 h	T=17 h	T=21 h	T=24h
F0138	Volumen de Pg (5 mg/ml), Conc. 2x dH ₂ O intercambiado	1008	1008	1209	858	372
F0139	Volumen de Pg (5 mg/mL) en Citrato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), pH 6,5	1008	30	37	39	60
F0140	Volumen de Pg (5 mg/mL) en fosfato de sodio 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), pH 7,2	1008	49	60	68	100
F0141	Volumen de Pg (5 mg/mL) en Tris 10 mM, NaCl 35 mM, arginina 28,5 mM (0,5 %), pH 8,0	1008	49	56	66	92

Ejemplo 11: Efecto del aminoácido en el transcurso del tiempo en la turbidez de la composición

30 Se midió la turbidez en composiciones que contienen 10 mg de plasminógeno y NaCl 35 mM con glicina, arginina, alanina al 0,5 % y sin aminoácidos, a pH 6,5 en amortiguador citrato de sodio (Figura 17), pH 7,2 en amortiguador fosfato de sodio (Figura 18) y a un pH 8,0 en amortiguador Tris (Figura 19).

35 Las composiciones evaluadas en las Figuras 17, 18 y 19 se reprodujeron en presencia de manitol al 0,5 % como agente espesante y se informó sobre esto en las Figuras 20, 21 y 22, respectivamente.

40 En todos los casos, la presencia de aminoácidos proporciona un efecto estabilizante y mantiene o disminuye la turbidez. Al comparar los tipos de aminoácidos, la arginina presenta el mejor efecto estabilizante y la menor turbidez en todos los pH analizados y en presencia y en ausencia del agente espesante, es decir, manitol al 0,5 %.

Ejemplo 12: composición con concentración elevada de plasminógenos

45 Se han estudiado las composiciones que contienen una concentración elevada de plasminógeno. Se informa sobre los conteos PMC para partículas de 10 µm o más, y de 25 µm o más en la Tabla 17 para composiciones de 20 mg/ml de plasminógeno en citrato de sodio 10 mM o 100 mM, NaCl 35 mM, a pH 6,5, con y sin arginina al 1 %, y composiciones de 37 y 56 mg/ml de plasminógeno en citrato de sodio 100 mM, NaCl 35 mM, a pH

6,5, con arginina al 1 %.

5 La Tabla 17 muestra que las formulaciones de la presente invención permiten ventajosamente la preparación de composiciones que comprenden concentraciones elevadas de plasminógeno (37 y 56 mg/ml) sin provocar un nivel inaceptable de partículas.

Tabla 17

Id muestra asignada	Descripción de muestra	Conteo PMC /Vial	
		10µm	25µm
P24138	Pg (20 mg/ml) Vol en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5	983	8
F0483	Pg (20 mg/ml) Vol en citrato de Na 10 mM, NaCl 35 mM, pH 6,5, arginina 57mM (1 %)	525	0
F0614	Pg (20 mg/ml) Vol en citrato de Na 10 mM, NaCl 100 mM, pH 6,5, arginina 57mM (1 %)	667	33
F0615	Pg (37 mg/ml) Vol en citrato de Na 10 mM, NaCl 100 mM, pH 6,5, arginina 57mM (1 %)	325	33
F0616	Pg (56 mg/ml) Vol en citrato de Na 10 mM, NaCl 100 mM, pH 6,5, arginina 57mM (1 %)	292	17

Ejemplo 13: Actividad de plasminógeno

10

La actividad del plasminógeno para cada formulación ejemplificada se estudió en la presente y se comparó con la actividad del plasminógeno de la preparación inicial o preparación en volumen (Pg en volumen). Se ha observado que la actividad del plasminógeno no es afectada por ninguna de estas formulaciones.

REIVINDICACIONES:

1. Una composición farmacéutica que comprende:

5 - plasminógeno, o una variante biológicamente activa del mismo que tenga al menos un 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de plasminógeno nativo, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 80 mg/ml;

10 - un modificador de la tonicidad, que se encuentra en una concentración ajustada para alcanzar una osmolalidad de la composición comprendida entre unos 180 mOsm y unos 350 mOsm, en donde el modificador de la tonicidad es cloruro sódico y está presente en una concentración comprendida entre unos 30 mM y unos 100 mM; y

15 - un agente estabilizador, que es arginina o glicina, en una concentración de entre unos 10 mM y unos 100 mM;

en donde la composición tiene un pH comprendido entre 5,0 y 8,0 aproximadamente, y

20 en donde dicho plasminógeno o una variante biológicamente activa del mismo consiste en más del 80% de Glu-plasminógeno o dicho plasminógeno o una variante biológicamente activa del mismo es Glu-plasminógeno, en donde el término "aproximadamente" abarca + o - 10% del valor correspondiente.

25 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde el pH es de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0; o de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5, en donde el término «aproximadamente» abarca + o - 10% del valor correspondiente.

30 3. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la composición contiene una cantidad de partículas igual o superior a 10 µm que es inferior a 6000 partículas por envase, en donde el envase tiene un contenido nominal inferior o igual a 100 ml.

4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en donde la cantidad de partículas es inferior a 2000 o 1000 partículas por envase, en donde el envase tiene un contenido nominal inferior o igual a 100 ml.

35 5. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, comprendiendo además un conservante; opcionalmente, en donde el conservante es m-cresol, alcohol bencílico, metanol, etanol, iso-propanol, butilparabeno, etilparabeno, metilparabeno, fenol, glicerol, xilitol, resorcinol, catecol, 2,6-dimetilciclohexanol, 2-metil-2,4-pentadiol, dextrano, polivinilpirrolidona, 2-clorofenol, cloruro de bencetonio, mertiolato (timersosal), ácido benzoico (propilparabeno) MW 180, 2, ácido benzoico MW 122,12, cloruro de benzalconio, clorobutanol, benzoato sódico, propionato sódico, cloruro de cetilpiridinio, o cualquier combinación de los mismos; y opcionalmente en donde la concentración del conservante es de aproximadamente 0,005 a 40 aproximadamente 10% (p/v), donde el término «aproximadamente» abarca + o - 10% del valor correspondiente.

45 6. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, que es adecuada para administración intravenosa, subcutánea, tópica, intradérmica, oftálmica y/o intramuscular.

7. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, en donde el agente estabilizante se encuentra en una concentración de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM, en donde el término «aproximadamente» abarca + o - 10% del valor correspondiente.

50 8. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación anterior, en donde la concentración del plasminógeno o variante biológicamente activa del mismo es de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, en donde el término "aproximadamente" abarca + o - 10% del valor correspondiente.

55 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en donde la concentración del plasminógeno o variante biológicamente activa del mismo es de aproximadamente 20, 10 o 5 mg/ml, en donde el término «aproximadamente» abarca + o - 10% del valor correspondiente.

60 10. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación anterior, en donde el plasminógeno o variante biológicamente activa del mismo representa al menos el 80% del contenido proteico total de la composición, más del 90% del contenido proteico total de la composición, más de aproximadamente el 95% del contenido proteico total de la composición, o más de aproximadamente el 98% del contenido proteico total de la composición, en donde el término «aproximadamente» abarca + o - 10% del valor correspondiente.

65 11. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, en donde el modificador de tonicidad está presente en una concentración de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 35 mM, en donde el término «aproximadamente» cubre + o - 10% del valor correspondiente.

12. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, que comprende además un azúcar no reductor.
- 5 13. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, en donde dicho plasminógeno o una variante biológicamente activa del mismo es plasminógeno humano.
14. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, para su uso como medicamento.

Figura 1A

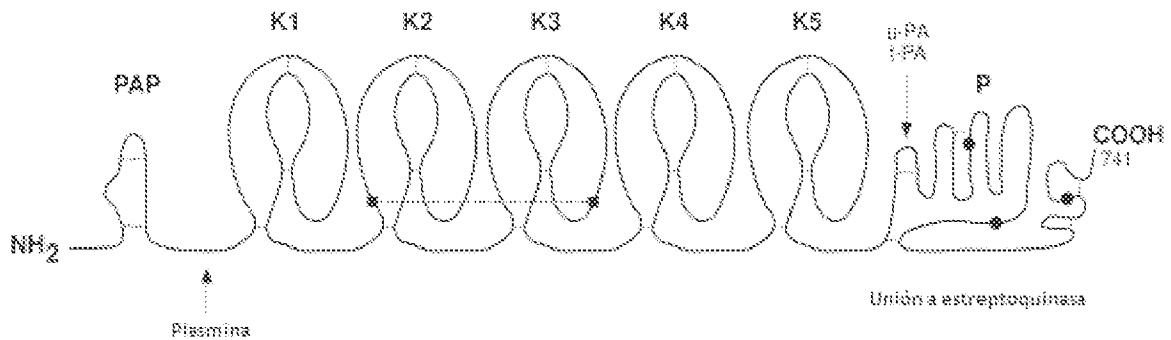


Figura 1B

Precursor de plasminógeno humano (acceso de UniProt # P00747)

```

1 mehkevlll llfksggqe plddyvntqg aslfsvtkkq lgagsieeca akceedeft
61 crafqyhske qqcvimaenr kssiiirmrd vvlfekkvyl secktgngkn yrgtmsktkn
121 gitcqkwsst sphrprfspa thpsegleen ycrnpdndpq gpwcyttde krydycdile
181 ceecmhcsq enydgkiskt msglecqawd sqsphahgyi pskfpnknk knycrnpdre
241 lrpwcfddp nkrwelcdip rctpppsgq ptyqclkgtg enyrgnavt vsghcqhws
301 aqtphtnrt penfpcknid encrnpdgk rapwchtns qvrweyckip scdsspvsste
361 qlaptappel tpvqdcyhg dgqsyrgtss tttgkkcqs wssmtphrh qkpenypnag
421 ltmnycrnpd adkgpwcftt dpsvrweycn lkkcsgteas vvappvvll pdvetpseed
481 cmfgngkgyr gkrattvtgt pcqdwaaqep hrhsiftpet npraglekny crnpdgdvvg
541 pwcyttmprk lydycdvpqc aapsfdcgpq qvepkcpgr vvggcvahph swpwqvslrt
601 rfgmhfcggt lispewvita ahcleksprp ssykvilgah qevnlephvq eievslrile
661 ptrkdiallk lsspavitdk vipaclpspn yvadrtecf vtgwgetqgt fgagllkeaq
721 lpvienkvcn ryefingrvq stelcaghla ggdscqgds ggplvcfekd kyilqgvtsv
781 glgcarpnkp gvyrvsvfv twiegvmrnn
    
```

Figura 2

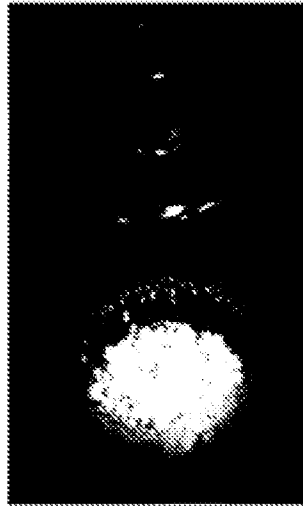


Figura 3



Figura 4



Figura 5



Figura 6



Figura 7

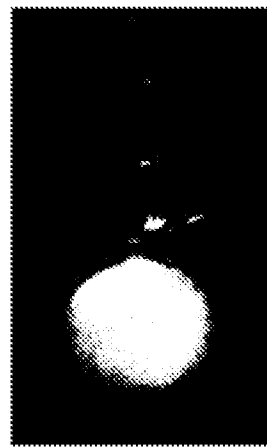


Figura 8



Figura 9



Figura 10

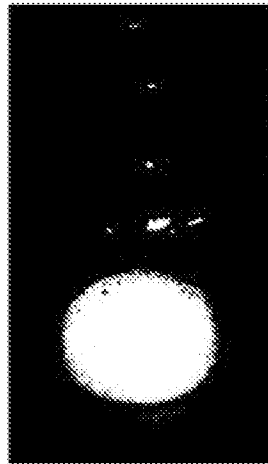


Figura 11



Figura 12



Figura 13



Figura 14

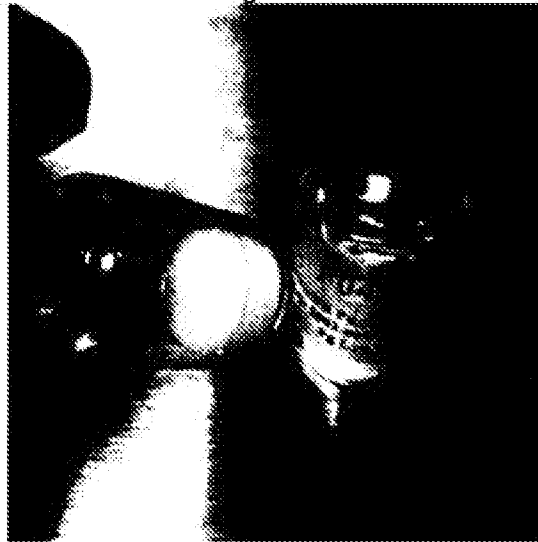


Figura 15



Estándares

Muestra 0

1

2

3

Figura 16



Estándares

Muestra 0

1

2

3

Figura 17

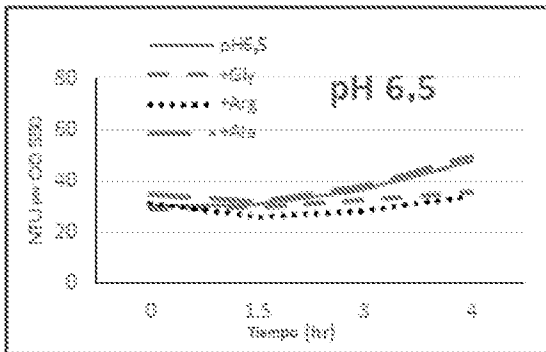


Figura 18

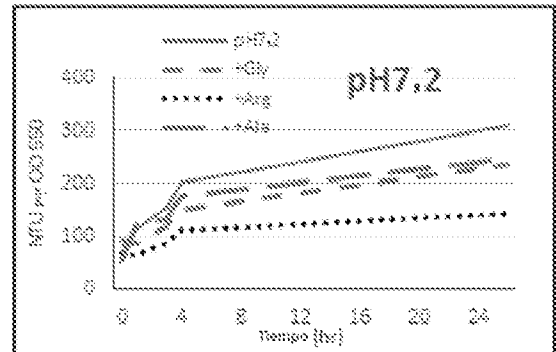


Figura 19

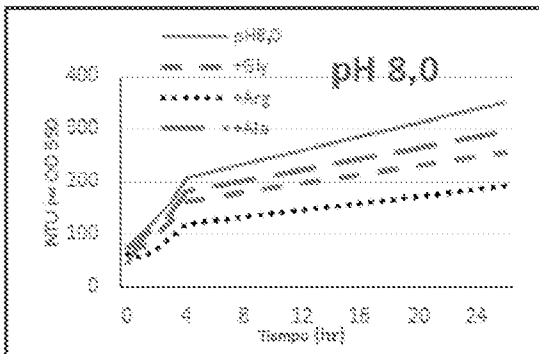


Figura 20

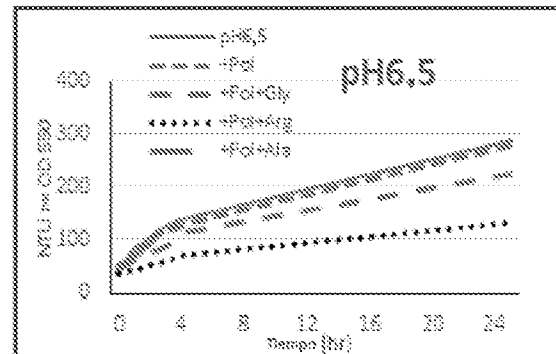


Figura 21

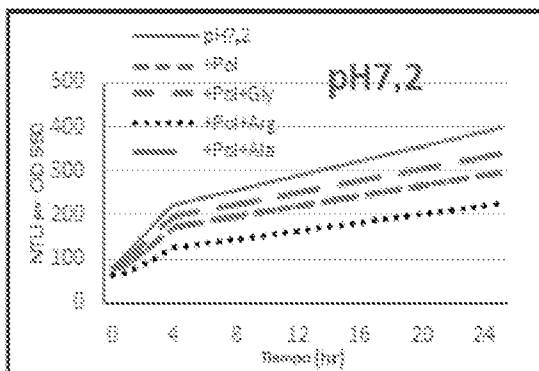


Figura 22

