



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 325 956**

(51) Int. Cl.:
A61K 38/36 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03770983 .9**

(96) Fecha de presentación : **21.07.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1528930**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **11.05.2005**

(54) Título: **Fármacos y preparaciones de principios activos farmacéuticos que contienen trombina y que pueden generar trombina.**

(30) Prioridad: **23.07.2002 AT A 1113/2002**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.09.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.09.2009

(73) Titular/es: **Bio & Bio Licensing S.A.**
49, boulevard du Prince Henri
1724 Luxembourg, LU

(72) Inventor/es: **Eibl, Johann**

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 325 956 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

Fármacos y preparaciones de principios activos farmacéuticas que contienen trombina y que pueden generar trombina.

La invención se refiere a una preparación de principios activos farmacéutica que contiene trombina y que puede generar trombina y a fármacos producidos a partir de la misma.

Introducción

Si se lesionan vasos sanguíneos entonces la sangre sale de la cavidad vascular y coagula. Los vasos sanguíneos lesionados se cierran mediante la sangre que coagula y protegen de ese modo al organismo de grandes pérdidas de sangre. La coagulación sanguínea se origina mediante la enzima trombina, que se genera a partir de su zimógeno, protrombina, y provoca la conversión de la proteína presente en el plasma sanguíneo fibrinógeno en fibrina insoluble. La sangre que sale coagula en el plazo de minutos, transformándose sólo una sexta parte del fibrinógeno contenido en el plasma en fibrina. En la sangre coagulada que todavía contiene mucho fibrinógeno continúa adicionalmente la formación de trombina, de modo que se produce finalmente una conversión completa del fibrinógeno total todavía presente en la sangre coagulada en fibrina. Este proceso de coagulación y formación de trombina continuada ocupa un tiempo más largo y tampoco puede finalizarse completamente hasta después de varias horas.

En la conversión de fibrinógeno en fibrina, la trombina provoca en primer lugar la separación o la separación parcial de los fibrinopéptidos A y B por ambos extremos terminales de la molécula de fibrinógeno, mediante lo cual se produce en primer lugar todavía monómeros de fibrina solubles. Éstos pueden agregarse lateralmente para dar fibrillas que se conforman entonces para dar una red de fibrina (Blombäck). Esta red de fibrina producida en la sangre coagulada se adhiere al tejido lesionado o al lecho de la herida y conduce de ese modo a la hemostasia y al cierre de la herida.

La trombina provoca también la transformación del factor de coagulación XIII, del zimógeno del factor de coagulación XIIIa, en una transglutaminasa. Ésta une proteínas tales como fibrina, monómeros de fibrina, fibrinógeno y otras proteínas que se producen en el plasma sanguíneo. Especialmente, la reticulación de fibrina es de gran significado para la estabilidad de la red de fibrina que se forma (Siebenlist *et al.*).

La trombina transforma también al inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI) en una carboxipeptidasa (TAFIa), que separa restos de lisina carboxilo terminales de la fibrina y debido a ello impide la formación del complejo tejido-plasminógeno-activador-plasminógeno-fibrina, que es necesaria para la transformación de plasminógeno en plasmina (Booth).

In vitro se posibilita la formación de trombina en la sangre o plasma sanguíneo y con ello la implantación del proceso de coagulación mediante extractos de tejido. Tales extractos pueden obtenerse de la mejor manera del cerebro con medios acuosos o también con disolventes orgánicos (Morawitz).

El material activo en la coagulación denominado tromboplastina, extraíble con disolución de tampón adecuada consiste en una apoproteína, el factor tisular y lípidos activos en la coagulación. Cantidades ya reducidas de tromboplastina, cuando se añaden a sangre o plasma, conducen a una rápida coagulación.

El componente activo en la coagulación extraíble con disolventes orgánicos del cerebro se denomina tromboplastina parcial y consiste esencialmente en lípidos activos en la coagulación. Entonces, en la adición a sangre o plasma sanguíneo, una rápida coagulación sólo se produce cuando se añaden sustancias aún de activación, tales como por ejemplo caolín o polvo de vidrio.

De ahí se produjo la idea de una cascada de activación de enzimas que finaliza después de todo en la producción de la enzima trombina, que da lugar a la coagulación sanguínea (Davie *et al.*; MacFarlane).

El proceso de coagulación desencadenado por la tromboplastina se denomina ruta extrínseca de la coagulación sanguínea, el proceso de coagulación provocado por la tromboplastina parcial se denomina ruta intrínseca. Ambos procesos tienen en común que transforman el factor de coagulación X en Xa, cuando están también en rutas diferentes. Según esto se distingue, en el caso de la primera parte del proceso de coagulación que conduce a la activación del factor de coagulación X, entre la ruta de la tenasa extrínseca e intrínseca. En un complejo enzimático adicional, la protrombinasa, el factor de coagulación Xa transforma protrombina en trombina. Este proceso se denomina ruta común. El sistema enzimático que genera el factor de coagulación Xa con ayuda de la tromboplastina se denomina complejo tenasa extrínseco, en contraposición con el sistema enzimático en el que la tromboplastina parcial desempeña un papel, el complejo tenasa intrínseco.

El aspecto predominante es que el factor tisular junto con el factor de coagulación VIIa desencadena la coagulación sanguínea tras las lesiones con la colaboración de las plaquetas (Rapaport *et al.*). El factor tisular se produce en casi todos los tejidos en cantidades muy distintas junto con lípidos activos en la coagulación y ambas sustancias forman, cuando entran en contacto con la sangre, el complejo tenasa extrínseco, dado que están presentes en la sangre cantidades reducidas de manera permanente del factor de coagulación VII activado (Drake *et al.*). El complejo tenasa

extrínseco transforma tanto el factor de coagulación X en Xa como el factor de coagulación IX en IXa, que convierte además X en Xa. Sin embargo, la activación del factor X y la formación de trombina resultante como consecuencia adicional se detienen muy rápidamente mediante el inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI). El complejo tenasa extrínseco formado de manera temporal así como el factor de coagulación XIa conducen independientemente entre sí a la activación del complejo tenasa intrínseco, que en relación a la activación del factor de coagulación X es aproximadamente 50 veces más activo que el complejo tenasa extrínseco. El complejo tenasa intrínseco está compuesto por los factores de coagulación IXa, VIIIa activados y fosfolípidos activos en la coagulación y no se inhibe por el TFPI (de Borne *et al.*). La enzima factor de coagulación IXa, que transforma el factor de coagulación X en Xa, aumenta en el complejo tenasa intrínseco en su acción de aproximadamente 100.000 a 1.000.000 veces. Este aumento tiene lugar mediante el cofactor VIIIa, que no es por sí mismo ninguna enzima, y determinados fosfolípidos en concentración de iones Ca óptima.

Dado que el complejo tenasa intrínseco transforma muy rápidamente el factor de coagulación X en Xa y éste con el cofactor Va y fosfolípidos activos en la coagulación activa a la protrombina, se produce una formación sumamente rápida de cantidades grandes de trombina (Mann *et al.*).

Los factores de coagulación individuales y las plaquetas (los componentes esenciales en la sangre responsables del proceso de coagulación) están presentes normalmente en gran exceso. No se hace notar una tendencia elevada a la hemorragia hasta en el caso de una disminución de aproximadamente el 90% o más de uno de estos componentes. No se producen hemorragias potencialmente mortales hasta que se producen estados de carencia en los que un factor de coagulación o las plaquetas presentan sólo algún porcentaje mayor de su valor normal. Si bien la importancia central del factor tisular para desencadenar el proceso de coagulación y su amplia propagación en todos los órganos no da lugar a dudas, en tejidos con contenido en factor tisular reducido se producen entonces justamente alteraciones graves de la coagulación sanguínea cuando un factor del complejo tenasa intrínseco o del complejo protrombinasa se reduce patológicamente. Los ejemplos más importantes de esto son pacientes que padecen hemofilia A o hemofilia B. La sangre de estos pacientes coagula aún en la mayoría de los casos, pero se produce, debido a la ausencia de formación o a la formación insuficiente del complejo tenasa intrínseco, una formación de trombina insuficiente en la sangre coagulada y una rápida disolución de la misma, de modo que no tiene lugar la hemostasia suficiente.

La trombina, de origen bovino en la mayoría de los casos, se utiliza como fármaco que no va a administrarse por vía parenteral para la hemostasia de lesiones superficiales. Su acción hemostática pudo mejorarse decisivamente mediante el uso conjunto con fármacos que contenían fibrinógeno (Grey; Young *et al.*). Ahora, fibrinógeno y trombina se obtienen de manera correspondiente a su empleo específico de especie predominantemente de material de partida alogénico. Mediante el uso combinado de trombina con fármacos que contienen fibrinógeno se intenta reproducir o mejorar la coagulación sanguínea fisiológica y la hemostasia que se produce a este respecto. Esto puede lograrse también en pacientes con trastornos graves de la coagulación sanguínea (Matras *et al.*).

Mediante el uso conjunto de concentrados de fibrinógeno, cuyo contenido en fibrinógeno asciende a de 10 a 20 veces el de la sangre, y altas cantidades de trombina (100 - 1000 U por ml) se logra llevar el tiempo de coagulación en una mezcla de trombina y fibrinógeno de este tipo al intervalo de segundos y en comparación con el tiempo de hemorragia fisiológico alcanzar una reducción de 10 a 100 veces. Debido a ello fue posible lograr, en el caso de una aplicación óptima de tales mezclas de trombina y fibrinógeno, prácticamente una hemostasia inmediata, en cuanto a que no se lesionaron vasos sanguíneos grandes, especialmente arteriales (Spängler).

El fibrinógeno convertido en fibrina mediante la trombina se adhiere lo mismo que la sangre coagulada al lecho de la herida, produciéndose también, aparentemente mediante las transglutaminasas activadas por la acción de la trombina, enlaces covalentes entre el tejido lesionado y la fibrina formada. Esta fuerte adherencia de la fibrina formada al tejido puede aprovecharse también para pegar tejidos que no sangran, dado que la fibrina formada en la mayoría de los casos no interfiere en la cicatrización del tejido pegado y en el plazo de días a semanas se degrada en gran parte (Matras *et al.*).

En contraposición con la introducción lo más rápida posible del proceso de coagulación en caso de hemostasia con mezclas de trombina y fibrinógeno se desea un inicio retrasado del proceso de coagulación en caso de pegar partes de tejido y en caso de obturaciones. Debido a ello se adaptan mejor las partes de tejido que van a pegarse y son necesarias adaptaciones similares también en caso de obturaciones. Hasta ahora, el retraso del proceso de coagulación se llevó a cabo mediante la disminución de la concentración de trombina hasta aproximadamente el 1% de la cantidad de trombina que se usa para la hemostasia. Sin embargo, el uso de concentraciones de trombina tanto altas como bajas conlleva distintas desventajas.

Disoluciones de fibrinógeno altamente viscosas con un contenido en fibrinógeno de entre el 5 y el 10% con cantidades de trombina de entre 100 y 1.000 unidades pueden llegar en el plazo de segundos a la coagulación: Este corto tiempo de coagulación es necesario, con ello tras aplicar una mezcla de este tipo sobre un sitio que sangra se establece la coagulación rápidamente y debido a ello la hemorragia llega a la hemostasia. La desventaja de un modo de proceder de este tipo es el escaso mezclado de la disolución de fibrinógeno con la disolución de trombina, dado que la alta viscosidad de la mezcla no permite un mezclado completo en un corto tiempo. Esto provoca una coagulación no homogénea y con ello un perjuicio de la calidad biomecánica.

ES 2 325 956 T3

Por otra parte existe, en caso de uso de mezclas de trombina y fibrinógeno que no se utilizan para la hemostasia sino para pegar las partes de tejido, en la mayoría de los casos la necesidad de retrasar la aparición de la coagulación en la mezcla de trombina y fibrinógeno para poder adaptar de manera óptima las partes de tejido que van a pegarse u obturarse, antes de que se produzca la coagulación. Esto se intenta actualmente mediante la reducción de la cantidad de trombina de en una décima parte a en una centésima parte de la cantidad usada para la hemostasia, sin embargo con la desventaja de que no puede transformarse todo el fibrinógeno presente en fibrina y el factor XIII en XIIIa. Tampoco en este modo de proceder puede obtenerse ninguna formación óptima de un coágulo de fibrina, dado que la concentración de trombina reducida no es suficiente para transformar TAFI en TAFIa.

El uso de material bovino para la producción de fármacos que contienen trombina representa un problema adicional. Dado que la posible transmisión de priones mediante cualquier tipo de órganos usados de bovinos no puede excluirse con seguridad, actualmente el uso de trombina bovina ha disminuido fuertemente.

La trombina bovina tiene la desventaja adicional de que actúa como antígeno para otras especies y puede originar alergias y anafilaxias. Además se observaron también alteraciones de la coagulación sanguínea en pacientes tratados con trombina bovina, dado que la trombina puede originar la formación de anticuerpos frente a factores de coagulación, que pueden reaccionar de manera cruzada con factores de coagulación humanos y de ese modo pueden retrasar la coagulación sanguínea.

En la producción de trombina a partir de protrombina se usó la tromboplastina, debido al buen rendimiento con frecuencia para la activación de la trombina, que se producía a partir de material de partida animal, en la mayoría de los casos de cerebro bovino. Debido a la posibilidad de transmisión de priones se excluye la tromboplastina a partir de material de partida animal en gran parte para la producción de trombina y se asume un peor rendimiento de trombina.

La invención propone por tanto entre otras cosas el objetivo de facilitar una preparación de principios activos farmacéutica que puede generar trombina, segura con respecto a virus, que

1. se formula para dar un fármaco que puede generar trombina y se mezcla con un fármaco que contiene fibrinógeno, da como resultado una mezcla completa y homogénea de estos componentes sin que se impida un mezclado completo por la coagulación demasiado rápida. Debe permitirse, sin embargo, no sólo el mezclado completo, sino también la adaptación de las partes de tejido que van a sellarse o que van a obturarse, antes de que se produzca la coagulación. La formación de trombina debe continuarse adicionalmente también tras la coagulación que se establece, para transformar todo el fibrinógeno, factor XIII y TAFI presentes en el coágulo en fibrina, factor XIIIa y TAFIa para garantizar un cierre de la herida formado por fibrina, permanente, y en el que
2. la protrombina contenida puede transformarse de la manera más completa posible en trombina y ésta puede utilizarse tras una purificación adicional para dar un fármaco que contiene trombina. Este fármaco puede usarse como tal o junto con otros fármacos que contienen fibrinógeno.

Los fármacos producidos a partir de las preparaciones de principios activos farmacéuticas que pueden generar trombina deben contener según su uso en caso de una especie determinada sólo material alogénico de esta especie e igualmente deben usarse en caso de la producción sólo proteínas específicas de especie. Todos los materiales auxiliares y materiales de partida usados deben excluir la posibilidad de transmisión de priones. La generación de trombina a partir de protrombina debe tener lugar de manera tan completa como sea posible *in vivo* e *in vitro*, dado que sólo está a disposición la protrombina presente en el coágulo para la formación de trombina adicional en el fibrinógeno ya coagulado.

La preparación de principios activos farmacéutica según la invención se utiliza para la producción de un fármaco que contiene trombina o que puede generar trombina y está caracterizada porque contiene:

- (A) protrombina obtenida a partir de plasma o mediante ingeniería genética (factor de coagulación II),
- (B) factores de coagulación V, VIII, IX, X obtenidos a partir de plasma o mediante ingeniería genética, que pueden encontrarse al menos parcialmente en estado activado, y factor de coagulación XIa obtenido a partir de plasma o mediante ingeniería genética, y
- (C) fosfolípidos activos en la coagulación, seguros con respecto a priones, que están contenidos dado el caso en liposomas.

La preparación de principios activos según la invención contiene preferiblemente factor de coagulación VII obtenido a partir de plasma o mediante ingeniería genética o una mezcla de factores de coagulación VII y VIIa obtenidos a partir de plasma o mediante ingeniería genética. Además contiene preferiblemente un factor tisular producido mediante ingeniería genética como tal o en forma relipidada.

La preparación de principios activos según la invención puede estar compuesta también por dos o más fracciones plasmáticas y los fosfolípidos activos en la coagulación, conteniendo la fracción plasmática individual uno o más factores de coagulación o factores de coagulación activados de los componentes (A) y (B). La mezcla de fracciones

ES 2 325 956 T3

plasmáticas total debe contener sin embargo todos los factores de coagulación o factores de coagulación activados contenidos en los componentes (A) y (B), añadiéndose preferiblemente aún el factor tisular.

5 Los factores de coagulación se producen de manera especial exclusivamente a partir de plasma sanguíneo de una determinada especie de mamífero o a partir de los correspondientes factores de coagulación o factores de coagulación activados obtenidos mediante ingeniería genética, incluyendo el factor tisular.

10 En la preparación de principios activos farmacéutica según la invención son seguros con respecto a virus de manera ventajosa la protrombina, los factores de coagulación V, VIII, IX, X, XIa y dado el caso los factores de coagulación VII y VIIa, así como el factor tisular mediante la inactivación de virus y/o la disminución de la concentración de virus.

La preparación de principios activos farmacéutica según la invención puede encontrarse en forma ultracongelada o liofilizada.

15 La invención se refiere además a un fármaco que puede generar trombina, que puede producirse a partir de una preparación de principios activos farmacéutica según la invención.

20 El fármaco que puede generar trombina según la invención puede encontrarse en estado ultracongelado o liofilizado.

Una forma de realización preferida del fármaco que puede generar trombina según la invención está caracterizada porque contiene además trombina en una cantidad tal que tras la descongelación o reconstitución no contiene más de 1 unidad de trombina por ml.

25 Una forma de realización ventajosa del procedimiento según la invención consiste en que la preparación de principios activos se vuelve segura con respecto a virus mediante inactivación de virus durante o tras la formación de trombina, así como mediante la disminución de la concentración de virus tras la formación de trombina concluida.

30 También se da a conocer un procedimiento para la producción de un concentrado de pro-cofactores que contiene los factores de coagulación V y VIII, y está caracterizado porque se disuelve el crioprecipitado obtenido a partir de plasma y se separa fibrinógeno de la disolución, obteniéndose una disolución que contiene los factores de coagulación V y VIII, que puede mezclarse con cloruro de calcio.

35 También se da a conocer la producción de un concentrado de complejo de protrombina que contiene el factor de coagulación XI, que contiene los factores de coagulación II, VII, VIIa, IX, X y XI, estando contenidos por 1,0 μ g de protrombina al menos 0,030 μ g de factor de coagulación XIa, y está caracterizado porque se adsorbe sobrenadante del crioprecipitado obtenido a partir de plasma en un intercambiador aniónico y tras lavar el material adsorbido y almacenarlo en frío se eluye el complejo de protrombina que contiene el factor de coagulación XIa.

40 La invención se basa en el conocimiento de que tiene lugar una formación controlable temporalmente, prácticamente completa de α -trombina a partir de protrombina segura con respecto a virus mediante un complejo tenasa-protrombinasa intrínseco seguro con respecto a virus. El complejo tenasa-protrombinasa intrínseco se forma mediante la activación de los correspondientes factores de coagulación seguros con respecto a virus o que se han vuelto seguros con respecto a virus en presencia de concentraciones óptimas de iones calcio con fosfolípidos activos en la coagulación, seguros con respecto a priones y la sustancia activadora segura con respecto a virus, factor de coagulación XIa, y/o las sustancias activadores seguras con respecto a virus, factor de coagulación VIIa y factor tisular.

50 Por consiguiente, el problema se soluciona según la invención con una preparación de principios activos farmacéutica, que consiste en tres componentes (componentes A, B y C) para la producción de un fármaco que contiene trombina o que puede generar trombina, seguro con respecto a virus, caracterizándose la preparación de principios activos farmacéutica porque

55 el componente A contiene una protrombina segura con respecto a virus, producida a partir de plasma o mediante ingeniería genética como sustancia farmacéuticamente activa

60 el componente B contiene factores de coagulación V, VIII, IX, X, XIa obtenidos a partir de plasma o mediante ingeniería genética, seguros con respecto a virus como sustancias farmacéuticamente activas y, en caso de que deba originarse además de la formación de los complejos protrombinasa y tenasa intrínseco también la formación de complejo tenasa extrínseco, contiene aún los factores de coagulación VII y/o VIIa seguros con respecto a virus así como el factor tisular como sustancias farmacéuticamente activas, y

65 el componente C contiene fosfolípidos activos en la coagulación, producidos de manera completamente sintética como sustancias farmacéuticamente activas con un punto de conversión que se encuentra por encima de 15°C de la forma paracristalina en la forma cristalina líquida. Una mezcla de las sustancias farmacéuticamente activas contenidas en los componentes (A) y (B), es decir los factores de coagulación o factores de coagulación activados, también puede obtenerse mediante el mezclado de dos o más fracciones plasmáticas en las que están contenidas todas las sustancias farmacéuticamente activas necesarias y en las que puede añadirse en caso necesario el factor tisular.

ES 2 325 956 T3

Tras mezclar los tres componentes y añadir una cantidad óptima de CaCl_2 se forma trombina de manera dependiente de la temperatura de entre 0°C y 40°C , aumentando la velocidad de formación de trombina con el aumento de la temperatura.

5 La producción del componente A tiene lugar mediante la disolución de protrombina segura con respecto a virus, liofilizada o la descongelación de una disolución congelada de protrombina segura con respecto a virus y la preparación de una disolución madre de protrombina con de 10 - 100 unidades de protrombina por ml y un contenido en citrato de sodio al 0,1% a pH 7,3.

10 La medida de la actividad de la disolución madre tiene lugar mediante la determinación de las unidades de protrombina con ayuda de un plasma deficiente en factor de coagulación II, con el que se creó una curva de calibración usando un plasma normal de referencia.

15 Con ayuda de ecarina se determinó la cantidad máxima de meizotrombina/trombina que puede generarse por una unidad de protrombina. La determinación de meizotrombina/trombina tiene lugar con el sustrato cromógeno S-2238. Además se determina la cantidad de trombina en unidades NIH que se genera a partir de una unidad de protrombina tras la adición de tromboplastina. Se genera una curva patrón correspondiente para la determinación de trombina con ayuda del patrón de α -trombina internacional.

20 El componente B se produce mediante el mezclado de disoluciones madre de factores de coagulación V, VIII, IX, X, XIa seguros con respecto a virus así como de los factores de coagulación VII, VIIa y el factor tisular. Las concentraciones de los factores de coagulación individuales en sus disoluciones madre se encuentran entre 10 - 100 unidades por ml; la disolución madre del factor tisular contiene $25 \mu\text{g/ml}$. El contenido de un factor de coagulación individual en una disolución madre se determina con ayuda del correspondiente plasma deficiente y se genera para la
25 determinación de cada factor de coagulación individual una curva patrón con plasma normal combinado.

Para comprobar qué cantidades de los factores de coagulación individuales son necesarias para obtener aún una generación óptima de trombina, se producen mezclas de los componentes A y B, que contienen cada uno una unidad de los factores de coagulación II, V, VIII, IX, X, XIa y II, así como XIa, VII, VIIa, con $2,5 \mu\text{g}$ de factor tisular por
30 ml de la mezcla básica. Tras la adición de la emulsión de liposomas y la recalcificación posterior se determina la formación de trombina a 26°C en intervalos de tiempo correspondientes. Igualmente, se comprueba en estas mezclas básicas el consumo de protrombina y la formación de β - y γ -trombina. La transformación de protrombina en trombina se realiza en presencia de PEG al 0,1% y se determinan aquellas cantidades de factores de coagulación y factor tisular por ml que son necesarias para lograr aún una generación de trombina óptima.

35 Pueden obtenerse también mezclas de componentes A y B a partir de dos o más fracciones plasmáticas, en cuanto a que contienen todos los factores de coagulación y factores de coagulación activados, que son necesarios para la formación de los complejos protrombinasa y tenasa intrínseco, como sustancias farmacéuticamente activas. La activación de la ruta tenasa intrínseca tiene lugar o bien mediante el factor de coagulación XIa o bien a través de la ruta tenasa extrínseca, especialmente cuando no está presente ningún TFPI. También es posible activar la ruta tenasa intrínseca simultáneamente mediante el factor de coagulación XIa y a través de la ruta tenasa extrínseca. En una mezcla de factores de coagulación, que son necesarios para la formación del complejo tenasa intrínseco, puede determinarse tanto mediante la adición como la presencia del factor de coagulación XIa si se transforma al menos el 90% de la protrombina presente en trombina, y cuando éste no sea el caso, qué cantidades de factor VIIa y factor tisular son
45 necesarias para lograr una tal transformación prácticamente completa de protrombina en trombina. Para la generación de trombina se usa un exceso de fosfolípidos activos en la coagulación. La activación se realiza o bien a 26°C o bien a 37°C y a una concentración óptima de iones Ca.

50 La seguridad con respecto a virus de los factores de coagulación usados o de las fracciones plasmáticas que contienen factores de coagulación, tales como del factor tisular obtenido mediante ingeniería genética, se logra mediante la inactivación de virus, por ejemplo según el procedimiento de disolvente/detergente y la disminución de la concentración de virus posterior por medio de nanofiltración.

55 El componente C se produce a partir de mezclas de fosfolípidos de colina o serina completamente sintéticos y debido a ello seguros con respecto a priones o a partir de fosfolípidos de colina-serina-etanolamina. Se usan sólo fosfolípidos cuya temperatura de transición de fase del estado de gel paracristalino al estado cristalino líquido se encuentra entre 15°C y 40°C . A partir de las mezclas de fosfolípidos se producen emulsiones que presentan liposomas con un diámetro de desde 20 nm hasta 1.000 nm y las partes polares de los fosfolípidos se han conformado en una membrana externa. Con ayuda de temperaturas entre 50°C y 100°C pueden producirse liposomas con un diámetro de
60 20 nm - 200 nm. Tales emulsiones pueden esterilizarse con ayuda de filtros impenetrables por bacterias, envasarse de manera estéril, secarse y guardarse y almacenarse bajo nitrógeno. Mediante la adición de agua pueden reconstituirse las emulsiones liofilizadas.

65 La seguridad con respecto a virus de los factores de coagulación usados y del factor tisular no relipidado se logra mediante la inactivación de virus, preferiblemente con el procedimiento de disolvente/detergente y amplia eliminación posterior del disolvente/detergente. En la disolución que contiene trombina quedan cantidades traza cuantificables del disolvente, fosfato de trinitrobutilo, y del detergente, Tween 80. La disminución de la concentración de virus tiene lugar preferiblemente mediante nanofiltración tras la filtración de clarificación anterior, que se logra por etapas con

ES 2 325 956 T3

filtros de poros cada vez más estrechos, que empieza con un ancho de poro de 5.000 nm, descendiendo hasta 35 nm. Preferiblemente, tras la filtración a través de un nanofiltro de 35 nm puede filtrarse aún a través de nanofiltros con ancho de poro de 20 nm y 15 nm.

- 5 La generación de trombina de esta preparación de principios activos farmacéutica depende mucho de la temperatura. Por tanto es posible, mediante el mezclado de los componentes A, B y C, incluso a concentración óptima de iones Ca, impedir la formación de trombina a partir de protrombina, siempre que se trabaje a temperaturas reducidas alrededor del punto de congelación. Para el almacenamiento puede ultracongelarse la preparación de principios activos según la invención. Sin embargo también pueden liofilizarse y almacenarse a temperaturas de entre 0°C y 25°C.

- 10 La preparación de principios activos farmacéutica, que puede generar trombina puede formularse, someterse a filtración estéril y envasarse en porciones a temperaturas reducidas para dar un fármaco con una capacidad de generar trombina de desde preferiblemente 100 hasta 1.000 unidades de trombina por ml.

- 15 La preparación de principios activos farmacéutica, que puede generar trombina se usa también para la producción de fármacos que contienen trombina. La generación de trombina se realiza preferiblemente a temperaturas de entre 20°C a 40°C.

- 20 Para la producción de trombina a partir de una preparación de principios activos farmacéutica, que puede generar trombina, en caso de que no se hayan sometido ninguno de o no todos los componentes a una inactivación de virus, puede realizarse la inactivación de virus durante o tras la generación de trombina. La eliminación de las sustancias que inactivan a los virus puede tener lugar junto con una purificación posterior de la trombina generada. Es posible obtener una preparación de principios activos farmacéutica que contiene trombina con un contenido en trombina de desde 1.000 hasta 10.000 unidades por ml, que puede disminuirse con respecto a la concentración de virus mediante filtraciones de clarificación y nanofiltración posterior. Entonces, la preparación de principios activos segura con respecto a virus puede formularse y someterse a filtración estéril para transformarse en un fármaco.

- 30 El uso de fármacos que pueden generar trombina y/o que contienen trombina junto con fármacos que contienen fibrinógeno puede usarse para la hemostasia, para la unión de tejidos en combinación con suturas o para la impermeabilización de cavidades huecas y vasos frente a la salida de gases y líquidos.

- Mediante el mezclado de un fármaco que puede generar trombina con un fármaco que contiene fibrinógeno y eventualmente la adición de cantidades reducidas de trombina puede ajustarse el tiempo de coagulación de una mezcla de este tipo a de 30 a 300 segundos. Debido a ello es posible un mezclado completo de los fármacos incluso a alta viscosidad de una mezcla de este tipo. Igualmente, tras el mezclado completo de los fármacos está a disposición un periodo de tiempo suficientemente prolongado para la adaptación necesaria de las partes de tejido, que deben pegarse o impermeabilizarse. Tras la aparición de la coagulación se produce entonces (de manera similar que en el proceso de coagulación fisiológico) una formación adicional de trombina en el fibrinógeno ya coagulado parcialmente, de modo que tras algún tiempo (hasta varias horas) se convierte prácticamente toda la protrombina en trombina y ésta transforma todo el fibrinógeno en fibrina. Una formación de trombina continua de este tipo no sólo permite la formación homogénea de fibrina en el fibrinógeno ya coagulado, sino también la activación uniforme de factor XIII y la reticulación establecida debido a ello de la fibrina formada, así como la activación de TAFI y la separación que tiene lugar debido a ello de los restos de lisina terminales de la fibrina.

- 45 El uso de mezclas que contienen fibrinógeno para la hemostasia necesita un tiempo de coagulación muy corto. Para lograr esto y aún así garantizar una formación homogénea del fibrinógeno coagulado y la activación de los zimógenos, tales como el factor XIII y/o TAFI, pueden mezclarse fármacos que contienen fibrinógeno completamente con fármacos que pueden generar trombina y entonces tales mezclas junto con una disolución de trombina, que presenta un alto contenido en trombina, se aplican en el sitio que sangra. Aunque la coagulación que se establece no conduce en primer lugar a un coágulo de fibrina homogéneo, la generación de trombina posterior del fármaco que puede generar trombina contenido en el coágulo de fibrina continúa la transformación de protrombina en trombina, de modo que se produce finalmente un coágulo de fibrina coagulado de manera homogénea con factor XIIIa distribuido de manera homogénea y TAFIa distribuido de manera homogénea. Debido a ello es posible conseguir, también en caso de mezclas que coagulan rápidamente de fármacos que contienen trombina con fármacos que contienen fibrinógeno, una estructura de fibrina distinguida y una resistencia especial frente a influencias fibrinolíticas.

- Una posibilidad adicional, en una mezcla de factores de coagulación que pueden generar trombina, compuesta por complejo protrombina y factor VIII, de desencadenar la formación de trombina espontánea, es la adición de factores del sistema de contacto.

- 60 Para esto deben añadirse los factores de coagulación XI y XII, en cuanto que ya no están presentes en la mezcla.

- La activación del factor de coagulación XI *in vivo* no está aún completamente clara en todos los detalles. Es seguro que las células sanguíneas y las células del endotelio en este proceso de activación desempeñan un papel esencial. El factor XI está unido en la sangre de forma no covalente al cininógeno de alto peso molecular ($K_d 10^{-8}$) y la protrombina ($K_d 10^{-7}$). Estos complejos pueden adicionarse a plaquetas activadas, produciéndose en presencia de trombina y/o factor de coagulación XIIa una activación del factor de coagulación XI.

In vitro, la activación del factor de coagulación XI mediante el factor de coagulación XIIa puede tener lugar en superficies cargadas negativamente, formándose el factor de coagulación XIIa mediante calicreína a partir del factor de coagulación XII. La formación de calicreína a partir de la precalicreína presente en la sangre puede tener lugar mediante mecanismos distintos, tales como por ejemplo mediante el activador de precalicreína o sales de metal del ácido elálgico.

Según la invención, en una mezcla de factores de coagulación que pueden formar trombina, compuesta por complejo de protrombina y factor de coagulación VIII, puede desencadenarse una generación de trombina espontánea mediante la activación del factor de coagulación XI contenido en la misma, inactivándose con respecto a virus previamente todos los componentes de esta mezcla. Preferiblemente, se realiza esta activación en presencia de fosfolípidos activos en la coagulación, seguros con respecto a priones con calicreína segura con respecto a virus. En lugar de calicreína puede usarse también precalicreína inactivada con respecto a virus con activador o activadores de precalicreína inactivado(s) con respecto a virus, tales como por ejemplo sales de metal del ácido elálgico.

Para la producción de principios activos farmacéuticos que contienen trombina puede tener lugar la inactivación de virus también durante o tras la generación de trombina.

La invención se describe en más detalle con los siguientes ejemplos.

20 Ejemplos

1. Producción del componente A

Se disuelven 100 mg de protrombina segura con respecto a virus en 1 l de disolución de citrato de sodio al 0,1% a pH 7,5 y se determina el contenido en protrombina por ml con ayuda de un plasma deficiente en protrombina. Igualmente, tras la adición de ecarina se determina la cantidad formada de meizotrombina y trombina mediante la transformación del sustrato cromógeno S-2238. Además se realiza la formación de trombina con ayuda de una preparación de protrombinasa. Se determina la trombina formada con ayuda de una disolución de fibrinógeno como tiempo de trombina. Con esta disolución de fibrinógeno se construyó anteriormente una curva patrón con ayuda del patrón internacional para α -trombina. Esta disolución madre de protrombina puede almacenarse congelada a -20°C al menos seis meses.

2. Producción del componente B a partir de factores de coagulación individuales

Se disuelven concentrados de factores de coagulación altamente purificados, seguros con respecto a virus, que se obtuvieron a partir plasma o mediante ingeniería genética, en citrato de sodio al 0,1%, pH 7,5 y se mezclan con agitación: 3,2 mg de factor V, 0,2 mg de factor VIII, 5,0 mg de factor IX, 11 mg de factor X y 0,5 mg de factor XIa. Tras el muestreo se congela la disolución y se almacena a -20°C o a temperaturas que se encuentran por debajo. En una muestra equivalente se determina la cantidad de una disolución de CaCl_2 1 M, que es necesaria para llevar la actividad de iones Ca de manera equivalente a una disolución de CaCl_2 5 mM - 8 mM.

3. Producción de una mezcla de los componentes A y B

Se descongelan cuidadosamente las disoluciones congeladas del componente A, producido según el ejemplo 1, y del componente B, producido según el ejemplo 2, no debiendo aumentar la temperatura por encima de 4°C. A partir de las disoluciones obtenidas se produce una mezcla de partes iguales del componente A y del componente B, se toman las muestras necesarias, y se congela de nuevo la mezcla de los componentes y se almacena a -20°C.

4. Producción de una mezcla de fracciones plasmáticas, que contiene los factores de coagulación de los componentes A y B

A partir de 10 l de plasma fuente ultracongelado se separa el crioprecipitado del sobrenadante del crioprecipitado, tras la descongelación cuidadosa, no superándose una temperatura de 4°C, mediante centrifugación a 6.000 g durante 15 minutos.

55 a. Concentrado de complejo de protrombina que contiene factor de coagulación XIa

Se mezcla el sobrenadante del crioprecipitado con 16 g de intercambiador aniónico débil DEAE-Sephadex A-50, se ajusta el valor de pH entre 7,8 y 8,8 con hidróxido de Na 0,1 normal y se agita durante una hora a una temperatura de entre 3°C y 6°C. Puede mantenerse la mezcla durante como máximo 24 horas a esta temperatura, antes de separarse el intercambiador iónico mediante filtración y/o centrifugación. Se reserva el líquido liberado del intercambiador iónico para la obtención de fracciones plasmáticas adicionales y se trata posteriormente el intercambiador iónico separado para la obtención del complejo de protrombina. Puede tener lugar el almacenamiento del intercambiador iónico separado de ese modo durante hasta 100 horas a una temperatura de entre 4°C y 6°C. Para el tratamiento posterior, el intercambiador iónico separado se lava dos veces con 1 l de disolución de cloruro de sodio al 0,5% cada vez y se obtiene el complejo de protrombina que contiene factor de coagulación XIa mediante la elución del intercambiador iónico con 1.000 ml de una disolución de NaCl 0,3 M a pH 7,5. Se lava el intercambiador iónico tras la elución de nuevo con 500 ml de disolución de cloruro de sodio 0,3 M a pH 7,5 y se combina el líquido de lavado con el eluato. En este eluato total se determina con ayuda de ecarina la cantidad presente de protrombina y se lleva

el eluato total mediante dilución al contenido en protrombina deseado, que puede encontrarse entre 2 y 5 unidades de protrombina por ml. El eluato total como concentrado de complejo de protrombina que contiene factor de coagulación XIa puede almacenarse tras la congelación en estado congelado a -20°C. Con ayuda de muestras que se tomaron antes de la congelación, se determina el contenido en factores de coagulación y factores de coagulación activados.

b. Producción de un concentrado de pro-cofactores

Se disuelve el crioprecipitado sedimentado a partir de plasma mediante centrifugación en 750 ml de tampón citrato al 0,3%, pH 7,0 y se mezcla con 110 g de glicina. Tras la agitación durante una hora a una temperatura de entre 0°C y 2°C se separa el fibrinógeno precipitado mediante centrifugación a 3.000 g con una duración de 15 minutos y se congela el sobrenadante que contiene los factores de coagulación V y VIII. En una muestra del sobrenadante diluida con agua 1:10 se determina el contenido en factor VIII, igualmente la cantidad de CaCl₂, que es necesaria para la recalcificación para obtener una actividad iónica equivalente a una disolución de CaCl₂ 5 mM. Puede almacenarse la disolución congelada a -20°C.

c. Producción de una mezcla de concentrado de protrombina que contiene factor de coagulación XIa y concentrado de pro-cofactores

Se añade una muestra recalcificada, diluida con agua destilada 1:10 del concentrado de pro-cofactores producido según el ejemplo 4.b en cantidades de 0,1; 0,2; 0,4 y 0,8 ml en cada caso a 1 ml del concentrado de protrombina producido según el ejemplo 4 a. A estas mezclas se les añade en cada caso 0,1 ml de una emulsión de liposomas producida según el ejemplo 5. Tras una incubación de 8 horas a 26°C se determina aquella cantidad del concentrado de pro-cofactores, que es necesaria para transformar el 90% o más de la protrombina presente en trombina.

Para la producción de la mezcla de concentrado de complejo de protrombina que contiene factor de coagulación XIa y concentrado de pro-cofactores, que se obtienen a partir de 10 l de plasma ultracongelado y se almacenan congelados, se mezclan estos concentrados tras la descongelación de manera correspondiente en la razón óptima hallada en la prueba anterior. Esta mezcla se congela y se almacena a -20°C.

5. Producción del componente C sin emulsionante

Se usan fosfolípidos completamente sintéticos y por tanto seguros con respecto a virus y priones. Se disuelven 200 mg de 2Na-1,2-di-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina, 400 mg de 1,2-di-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina y 400 mg de di-oleoil-etanolamino-fosfolípido en 10 ml de cloroformo y se evapora hasta sequedad la disolución en un matraz redondo de 250 ml mediante calentamiento y giros continuos del matraz. Con ayuda de una corriente de nitrógeno se eliminan completamente los restos de cloroformo y se añaden 10 ml de una disolución de tampón citrato al 0,1%, pH 7,3. Se emulsiona la película fosfolipídica que se encuentra en la pared interna del matraz redondo completamente en la disolución de tampón a 65°C y durante la emulsión se agita tanto con un dispositivo vórtex reiteradamente hasta que desaparece toda la película lipídica de la superficie interna del matraz. Se diluye la emulsión como tal o 1:10 con tampón citrato al 0,1%, pH 7,0, se filtra a través de un filtro con un diámetro de poro de 0,45 µm y a continuación se somete a filtración estéril a través de un filtro con un ancho de poro de 0,22 µm. Puede almacenarse de manera estéril esta emulsión de liposomas en el frigorífico y se agita antes de su uso con un dispositivo vórtex durante 1 minuto. Se somete a prueba la emulsión de manera correspondiente a la Farmacopea Europea en cuanto a esterilidad y ausencia de pirógenos (Farm. Eur. 4ª edición 2002 páginas 123-126, 2.6.1. Sterility. Páginas 131 - 132, 2.6.8. Pyrogens).

6. Producción del componente C con colato de sodio

Se disuelven 250 mg de 2Na-1,2-di-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina, 750 mg de 1,2-di-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina y 500 mg de colato de sodio en 10 ml de una mezcla 1 + 1 de cloroformo y alcohol metílico y se evaporan ambos disolventes a vacío, de manera que se produce una película delgada uniforme en la pared interna de un matraz redondo. Se separa la película por lavado de la pared del recipiente con 10 ml de tampón citrato al 0,1%, pH 7,3 y se trata posteriormente y se somete a filtración estéril la emulsión así obtenida tal como en el ejemplo 1.

7. Sustancias activadoras seguras con respecto a virus para la activación de la ruta tenasa intrínseca

Como sustancia activadora se usa o bien el factor de coagulación XIa solo, o junto con el factor de coagulación XI o bien el factor de coagulación VIIa, preferiblemente con el factor tisular. También puede usarse el factor de coagulación XIa junto con el factor de coagulación VIIa y el factor tisular. Para el uso de los factores de coagulación activados o del factor tisular como sustancias farmacéuticamente activas se inactivan con respecto a virus mediante un procedimiento de disolvente/detergente y tras la eliminación del disolvente/detergente se someten a una disminución de la concentración de virus mediante nanofiltración.

Las siguientes sustancias farmacéuticamente activas disueltas en un tampón citrato al 0,3%, pH 7,3 se usan como disoluciones madre de las sustancias activadoras:

a. 30 µg de factor XIa/ml;

b. 30 µg de factor XIa y 50 ng de factor XI/ml;

ES 2 325 956 T3

- c. 30 μg de factor XIa y 20 ng de factor VIIa/ml;
- d. 30 μg de factor XIa y 20 ng de factor VIIa y 10 ng de factor tisular/ml;
- e. 10 μg /ml de factor tisular

Para la elección de la sustancia activadora más adecuada se añaden en cada caso 10 μl de una serie de dilución de las sustancias activadoras individuales en cada caso a 1 ml de mezcla de factores de coagulación, que se obtiene según el ejemplo 3 ó 4 y se mezclan con 10 μl de una emulsión de liposomas diluida 1:100 según el ejemplo 5. Tras la recalcificación llevada a cabo se mantienen las mezclas a 26°C o 37°C. En intervalos de 10, 30, 60 y 120 min. con ayuda del sustrato cromógeno S-2251 se determina la cantidad formada de factor Xa. Esa sustancia activadora se usa para la producción de una preparación de principios activos farmacéutica, que puede generar trombina, que forma con las mezclas de factores de coagulación producidas según el ejemplo 3 ó 4 tras la recalcificación la mayor cantidad de factor Xa.

8. *Determinación de las cantidades necesarias de componente C, que en una mezcla de los componentes A y B en el plazo de 8 horas a 26°C o 2 horas a 37°C transforman al menos el 90% de la protrombina presente en trombina*

Se mezclan las mezclas de factores de coagulación según el ejemplo 3 ó 4, que en caso necesario se mezclan además con las cantidades determinadas según el ejemplo 7 de sustancia activadora, con cantidades crecientes de emulsión de liposomas. En cada caso a 10 ml de una mezcla de factores de coagulación se le añaden 0,1, 0,2, 0,4 y 0,8 ml de una emulsión de liposomas producida según el ejemplo 5 diluida 1:100 y tras la recalcificación se incubó a 26°C durante 8 horas o a 37°C durante 2 horas. Se determina la cantidad más reducida de la emulsión de liposomas, que es necesaria para convertir al menos el 90% de la protrombina presente en trombina.

9. *Producción de una preparación de principios activos farmacéutica segura con respecto a virus, que puede generar trombina*

Se mezcla en la cantidad correspondiente una mezcla de factores de coagulación segura con respecto a virus, producida según el ejemplo 3 (componentes A y B) tras la descongelación, en caso necesario, con una sustancia activadora segura con respecto a virus, seleccionada según el ejemplo 7 y se agita la mezcla a de 0°C a 2°C durante 15 minutos. A esta mezcla se le añade la cantidad determinada según el ejemplo 5 de la emulsión de liposomas (componente C). Esta mezcla se lleva con cloruro de sodio sólido a una concentración del 0,9% de NaCl, en caso necesario se somete a filtración de clarificación y entonces se somete a una filtración estéril a través de un filtro con un ancho de poro de 0,22 μm y/o 0,1 μm . Todas las manipulaciones, inclusive la filtración estéril, tienen lugar a una temperatura de entre 0°C y 2°C. La preparación de principios activos que puede generar trombina así obtenida se congela tras el muestreo y se almacena a -20°C. Se realizan los ensayos necesarios en cuanto a la estabilidad y la ausencia de pirógenos según la Farmacopea Europea. En controles en procedimiento y en el filtrado estéril se determina la capacidad de generar trombina tras la recalcificación a 37°C durante 2 horas e igualmente la protrombina activable por ecarina, aún presente, para garantizar la conversión de al menos el 90% de la protrombina presente en trombina.

10. *Producción de una preparación de principios activos farmacéutica segura con respecto a virus, que contiene trombina*

Se descongela la mezcla congelada, producida según el ejemplo 4 a partir de un concentrado de complejo de protrombina que contiene factor XIa y un concentrado de pro-cofactores y se mezcla, si es aún necesario según el ejemplo 7, con una cantidad calculada, seleccionada, de sustancia activadora. Mediante la adición de 10 mg de Tween 80 y 0,3 mg de fosfato de trinitrobutilo por g de proteína de la mezcla de factores de coagulación a 26°C tras la recalcificación llevada a cabo y la adición de una cantidad determinada según el ejemplo 6 de la emulsión de liposomas se transforma en ocho horas la cantidad principal de protrombina en trombina y se realiza simultáneamente la inactivación de virus necesaria.

La disolución que contiene trombina o bien puede congelarse y almacenarse o bien puede tratarse posteriormente de manera inmediata o tras la re-descongelación. Mediante la adición de una disolución de citrato de sodio correspondiente se ajusta una molaridad de 25 mM y un valor de pH de 6,5 y se añade con agitación adicional a temperatura ambiente tanto polietilenglicol con un peso molecular de entre 6.000 y 8.000, hasta que se produce una disolución al 0,1%. Entonces se añade con agitación una suspensión de CM-Sepharose al 20%, lavada con citrato de sodio 0,025 M, pH 6,5, hasta que se adsorbe al menos el 95% de la trombina presente en la CM-Sepharose. Se determina la cantidad necesaria de CM-Sepharose en una prueba previa, determinando la cantidad más baja de la emulsión al 20% que adsorbe al menos el 95% de la trombina presente. Se separa la CM-Sepharose por centrifugación durante 30 minutos entre 3.000 y 5.000 g, se resuspende el sedimento en tampón citrato 25 mM, pH 6,5 y se vierte en una columna correspondiente. Se lava la columna con tampón citrato al 1%, que contiene aún el 0,1% de PEG, a pH 6,5 y se eluye con un gradiente de cloruro de sodio en presencia del 0,1% de citrato y el 0,1% de PEG a pH 6,5. Se genera un gradiente de cloruro de sodio de entre 10 y 200 mM. Se reúnen las fracciones que contienen la mayor parte de trombina, se diafiltran y debido a ello se llevan a una concentración de aproximadamente 500 U de trombina por ml. Una disolución de este tipo puede congelarse, almacenarse tras la liofilización o tratarse posteriormente de manera inmediata.

ES 2 325 956 T3

Tras la filtración de clarificación previa a través de filtros de distintos tamaños de poro de entre 5.000 y 75 nm, se filtra la disolución que contiene trombina a través de un nanofiltro con tamaño de poro de 35 nm y preferiblemente a través de nanofiltros adicionales con diámetros de poro de 20 y 15 nm. Se concentra la disolución de trombina disminuida con respecto a la concentración de virus, así obtenida, mediante ultrafiltración con ayuda de un filtro 30 KD hasta un contenido superior a 5.000 U de trombina por ml y se almacena congelada o liofilizada.

11. *Producción de un fármaco seguro con respecto a virus que puede generar trombina*

Se diluye una muestra equivalente del principio activo farmacéutico seguro con respecto a virus, congelado o liofilizado, producido según el ejemplo 9, con una disolución de NaCl al 0,9% de modo que la muestra genera tras la recalcificación a 37°C en el plazo de 2 horas 500 ± 50 unidades de trombina por ml.

Se mezcla una muestra diluida de este tipo con partes iguales de un fármaco que contiene fibrinógeno al 5-10%, que se prevé como componente de un kit de adhesivo de fibrina, y se determina el tiempo de coagulación de esta mezcla tras la recalcificación. Cuando el tiempo de coagulación a 37°C es mayor de 150 segundos, a la preparación de principios activos según el ejemplo 7 se añade además tanta trombina producida según el ejemplo 8 hasta que el tiempo de coagulación haya disminuido hasta entre 100 y 150 segundos.

Se añaden las cantidades así determinadas de trombina al principio activo obtenido según el ejemplo 9 con agitación a una temperatura de entre 0°C y 2°C y se somete a filtración estéril esta mezcla tras la filtración de clarificación. La disolución a granel estéril obtenida se divide, se carga y se liofiliza preferiblemente a la misma temperatura reducida en botellitas para consumo final. La disolución del polvo liofilizado tiene lugar con una disolución estéril de CaCl₂ 5 mM.

12. *Producción de un fármaco seguro con respecto a virus, que contiene trombina*

Se lleva una preparación de principios activos según el ejemplo 10 tras la descongelación o la disolución con cloruro de sodio a una concentración del 0,9% de NaCl y entonces mediante la adición de una disolución de cloruro de sodio isotónica se ajusta la concentración de trombina deseada hasta entre 500 y 5.000 unidades por ml. Se añade tanto PEG que se produce una disolución al 0,1% y con ayuda de una disolución de CaCl₂ al 10% se obtiene una disolución de CaCl₂ 5 mM. Se somete a filtración estéril esta disolución, se divide, se embotella de manera estéril en recipientes para consumo final y puede congelarse o almacenarse tras la liofilización. La reconstitución de la disolución de trombina liofilizada tiene lugar con WFI (*water for injection*, agua para inyección).

13. *Uso de un fármaco que puede generar trombina junto con un fármaco que contiene trombina*

Se mezcla 1 ml de un fármaco que contiene fibrinógeno, que contiene 50 - 100 mg de fibrinógeno por ml, con 1 ml de un fármaco que puede generar trombina según el ejemplo 11. Se agita intensamente la mezcla de estos dos fármacos en condiciones estériles durante aproximadamente 20 segundos y la mezcla homogénea así obtenida se aplica al sitio que va a pegarse o impermeabilizarse, después de que se hayan adaptado las partes de tejido que van a pegarse o impermeabilizarse, y se mantienen tanto en la posición adaptada hasta que se coagula la mezcla de los dos fármacos. En caso necesario, pueden permanecer las partes de tejido en una posición fijada aún durante más tiempo, que puede ascender hasta varias horas.

14. *Uso de fármaco que contiene trombina*

A 2,0 ml de una mezcla de fármacos según la invención según el ejemplo 13 se le añaden 0,2 ml de un fármaco que contiene trombina según el ejemplo 12 con 2.000 unidades de trombina por ml y se mezclan rápidamente. Se aplica esta mezcla rápidamente a los sitios que sangran para dar la hemostasia, a ser posible tras la eliminación de la sangre acumulada, o bien mediante extracción por succión o aspiración o bien mediante vaciado por soplado de la sangre.

15. Determinación del factor de coagulación XI y del factor de coagulación XII en eluatos de intercambiador iónico según el ejemplo 4a, que no se almacenan tras su carga sino que se eluyen inmediatamente tras el lavado del intercambiador iónico cargado. La determinación tiene lugar con ayuda de los correspondientes plasmas deficientes en factores de coagulación de American Diagnostica.

16. Determinación de calicreína y precalicreína en eluatos de intercambiadores iónicos, que se cargaron con complejos de protrombina y tras el lavado se eluyeron inmediatamente o no hasta después del almacenamiento hasta 100 horas a temperatura del frigorífico. Se determina la actividad de calicreína con ayuda del sustrato cromógeno S-2403, usándose para la determinación una disolución de sustrato cromógeno 4 mM, que en la mezcla básica total se encuentra a una concentración de 0,4 mM. Se determina igualmente la concentración de precalicreína con sustrato cromógeno S-2403, mezclando el eluato en una dilución 1:10 con un volumen igual de una suspensión de caolín al 0,5% e incubando durante 5 minutos a 37°C con agitación. De la extinción medida se resta la extinción que se obtiene sin activación con la suspensión de caolín y se determinan las cantidades o unidades de precalicreína en una curva patrón.

17. Determinación de activador de precalicreína. La determinación tiene lugar del mismo modo que la determinación de precalicreína, sólo que en lugar de suspensiones de caolín se produce una serie de concentraciones de activadores de precalicreína. Cuando se usan sales de cobre del ácido elágico se usa una serie de concentraciones de

entre 10 ng y 10000 ng, que forma la cantidad máxima de calicreína a partir de una cantidad dispuesta previamente de precalicreína en el plazo de 5 minutos a 37°C.

18. Producción de emulsiones de fosfolípidos vegetales y/o sintéticas a partir de L- α -fosfatidilcolina, L- α -fosfatidil-L-serina y L- α -fosfatidiletanolamina, que tiene lugar de la misma forma que se indica en el ejemplo 5.

19. Determinación de TAFIa. La determinación de TAFIa tiene lugar con ayuda de un kit de actividad TAFI cromogénico de American Diagnostika sin la adición de activador (trombina). Se calcula el contenido en TAFIa a partir de una curva patrón, que se determinó con diluciones de plasma y activación posterior con trombina y medición de la actividad TAFIa con ayuda de un sustrato cromógeno.

20. Determinación del factor de coagulación XIIIa. La determinación del factor XII activado tiene lugar según la Farmacopea Europea supl. 4.5. 07/2003, pág. 3687 sin el uso de activadores del factor XIII (trombina).

21. Tratamiento con ultrasonidos de emulsiones de fosfolípidos. Se producen suspensiones al 1% mediante dilución con disolución isotónica de cloruro de sodio a partir de las mezclas de fosfolípidos y se someten 2 ml a una sonorización. Se realiza la sonorización con el desintegrador de ultrasonidos Sonifire II W-250. La potencia de salida asciende como máximo a 200 vatios a una frecuencia de trabajo de 20 kHz. Se usó el convertidor 102 C con resonador convencional con micropunta de 1/2" 101-148-062. Se realiza el periodo de sonorización entre 10 y 100 segundos sin enfriamiento de la emulsión sonorizada en la etapa 1 y en un intervalo de pulsos del 10%. Se realiza la actividad de la emulsión de fosfolípidos sonorizada con ayuda de un plasma de referencia y una suspensión de caolín mediante la determinación del tiempo de tromboplastina parcial. Se incuban 100 μ l de plasma con 50 μ l de una emulsión de liposomas y 50 μ l de una suspensión de caolín al 0,5% durante 5 minutos a 37°C, se recalcifican y se determina el tiempo de coagulación a 37°C. Se determina la cantidad necesaria de emulsión de liposomas que da lugar al tiempo de coagulación más corto. Puede determinarse la actividad de las emulsiones de liposomas mencionadas en el ejemplo 5 y 6 al igual que las emulsiones de fosfolípidos mencionadas en el ejemplo 18 mediante este método.

22. Determinación de la concentración de iones Ca adecuada para el ajuste deseado del tiempo de coagulación de una preparación de principios activos farmacéutica que puede generar trombina. Se producen las preparaciones farmacéuticas que generan trombina y se mezcla la preparación farmacéutica que va a someterse a prueba en una serie de diluciones geométrica con iones Ca, en la que la concentración más alta de iones Ca es 1 mM. Se fija la serie de diluciones desde 125 μ m hasta 1000 μ m. De igual manera se fija una serie de concentraciones de iones Ca desde 10 mM hasta 640 mM y se determina el tiempo de coagulación. Se determina la concentración de iones Ca necesaria con ayuda de una curva patrón.

Bibliografía

Blombäck B. Fibrinogen: Evolution of the Structure-Function Concept: Keynote Address at Fibrinogen 2000 Congress. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 2001; 936: 1-10.

Booth N.A. TAFI Meets the Sticky Ends. *Thromb. Haemost.* 2001; 85:1-2.

Davie E.W., Ratnoff O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964; 145:1310-12.

Drake T.A., Morrissey J.H., Edgington T.S. Selective cellular expression of tissue factor in human tissue. Implication for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am. J. Path.* 1989; 134:1087-97.

Grey E.G. Fibrin as a haemostatic in cerebral surgery. *Surg. Gyn. Obst.* 1915; 21:452-454.

MacFarlane R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964; 202:498-9.

Mann K.G., Jenny R.J., Krishnaswamy. Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Ann. Rev. Biochem.* 1988; 57:915-56.

Matras H. et al. Zur Klebung von Nerven Anastomosen mit Gerinnungssubstanzen. *Fortschr. Kiefer-Gesichts-Chir.* 1976; 112-114.

Morawitz P. Die Chemie der Blutgerinnung. *Ergebn. d. Physiol.* 1905; 4:307.

Rapaport S.I., Rao L.V.M. The Tissue Factor Pathway: How it has become a "Prima Ballerina". *Thromb. Haemost.* 1995; 74:7-17.

Siebenlist K.R., Meh D.A., Mosesson M.W. Protransglutaminase (F-XIII) mediated cross-linking of fibrinogen and fibrin. *Thromb. Haemost.* 2001; 86: 1221-8.

Spängler H.P. Gewebeklebung und lokale Blutstillung mit Fibrinogen, Thrombin und Blutgerinnungsfaktor XIII (Experimentelle Untersuchungen und klinische Erfahrungen). *Wien. klin. Wschr.* 1976; 88(4): 3-18.

ES 2 325 956 T3

von dem **Borne** P.A.K., **Koppelman** S.J., **Bouma** B.N. *et al.* Surface independent factor XI activation by thrombin in the presence of high molecular weight kininogen. *Thromb. Haemost.* 1994; 72:397-402.

Young F. *et al.* "Suture" of Wounds by Plasma-Thrombin Adhesion. *War Med.* 1944; 6:80-85.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Preparación de principios activos farmacéutica para la producción de un medicamento que contiene trombina o que puede generar trombina, **caracterizada** porque contiene:
 - (A) protrombina obtenida a partir de plasma o mediante ingeniería genética (factor de coagulación II),
 - (B) factores de coagulación V, VIII, IX, X obtenidos a partir de plasma o mediante ingeniería genética, que pueden encontrarse al menos parcialmente en estado activado, y factor de coagulación XIa obtenido a partir de plasma o mediante ingeniería genética, y
 - (C) fosfolípidos activos en la coagulación, seguros con respecto a priones, estando contenidos los fosfolípidos dado el caso en liposomas.
2. Preparación de principios activos farmacéutica según la reivindicación 1, **caracterizada** porque contiene también factor de coagulación VII obtenido a partir de plasma o mediante ingeniería genética o una mezcla de factores de coagulación VII y VIIa obtenidos a partir de plasma o mediante ingeniería genética.
3. Preparación de principios activos farmacéutica según una de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizada** porque contiene un factor tisular producido mediante ingeniería genética como tal o en forma relipidada.
4. Preparación de principios activos farmacéutica según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque los factores de coagulación se producen exclusivamente a partir de plasma sanguíneo de una determinada especie de mamífero o se producen a partir de los correspondientes factores de coagulación obtenidos mediante ingeniería genética o factores de coagulación activados, incluyendo factor tisular.
5. Preparación de principios activos farmacéutica según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque la protrombina, los factores de coagulación V, VIII, IX, X, XIa y dado el caso los factores de coagulación VII y VIIa, así como el factor tisular son seguros con respecto a virus mediante la inactivación de virus y/o la disminución de la concentración de virus.
6. Preparación de principios activos farmacéutica según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque se encuentra en forma ultracongelada o liofilizada.
7. Fármaco que puede generar trombina, que puede producirse a partir de una preparación de principios activos farmacéutica según una de las reivindicaciones 1 a 5.
8. Fármaco que puede generar trombina según la reivindicación 7, **caracterizado** porque se encuentra en estado ultracongelado o en estado liofilizado.
9. Fármaco que puede generar trombina según la reivindicación 7, **caracterizado** porque contiene adicionalmente trombina en una cantidad tal que tras la descongelación o reconstitución no contiene más de 1 unidad de trombina por ml.
10. Preparaciones de principios activos farmacéuticas según las reivindicaciones 1-6, de complejos de protrombina que contienen factor de coagulación-XI y factor de coagulación-XII, que generan trombina, inactivados con respecto a virus, que se activan preferiblemente en presencia de fosfolípidos activos en la coagulación mediante la adición de calicreína inactivada con respecto a virus o segura con respecto a virus o precalicreína inactivada con respecto a virus o segura con respecto a virus y con activadores de precalicreína seguros con respecto a virus.
11. Preparaciones de principios activos farmacéuticas según las reivindicaciones 1-6 y 10, que además de complejos de protrombina también contienen además TAFI o TAFI y factor de coagulación XIII y presentan tras la activación de protrombina un contenido de al menos 3 U (50 µg) de TAFIa o 3 U de TAFIa y 5 U de factor de coagulación XIIIa por 1000 U de trombina.
12. Preparaciones de principios activos farmacéuticas según las reivindicaciones 1-6, 10 y 11 y preparaciones de mezclas de fármacos según las reivindicaciones 7-9, **caracterizadas** porque se usan fosfolípidos activos en la coagulación, seguros con respecto a priones, de origen vegetal o de tal origen vegetal o sintético, preferiblemente en una razón de fosfatidilcolinas con respecto a fosfatidilserinas de 3 + 1 o de fosfatidilcolinas con respecto a fosfatidilserinas con respecto a fosfoetanolaminas de 2 + 2 + 1.
13. Producción de preparaciones de principios activos farmacéuticas según las reivindicaciones 1-6, 10, 11 y 12 así como de fármacos según las reivindicaciones 7-9, **caracterizada** porque las emulsiones de fosfolípidos que van a usarse se someten además a un tratamiento de ultrasonidos y posteriormente en todo caso a una filtración estéril.
14. Producción de fármacos seguros con respecto a virus, que pueden generar trombina según la reivindicación 9 y preparaciones de principios activos farmacéuticas según las reivindicaciones 10 y 11, usándose como componente C emulsiones de fosfolípidos producidas según la reivindicación 13.