

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 845 143**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/48** (2006.01)

**A61K 9/19** (2006.01)

**C12N 9/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2005 E 05380229 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2020 EP 1649867**

54 Título: **Composición de trombina estable**

30 Prioridad:

**22.10.2004 ES 200402523**

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

**26.07.2021**

73 Titular/es:

**GRIFOLS, S.A. (100.0%)**

**C/Jesús y María, 6**

**08022 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**JORQUERA NIETO, JUAN IGNACIO;**

**RISTOL DEBART, PERE;**

**FERNANDEZ RODRIGUEZ, JESUS;**

**BRAVA CAMISON, ISABEL y**

**LOPEZ GOMEZ, RAFAEL**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

**ES 2 845 143 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 de trombina estable

5 La presente invención se refiere a una composición de trombina estable en solución para uso terapéutico, como componente de adhesivos de fibrina u otros usos hemostáticos, que puede ser sometida a doble nanofiltración para retener virus, y que puede ser conservada en estado liofilizado o congelado.

ANTECEDENTES

10 La trombina es una serín-proteasa, generada en la sangre en circulación por activación de su precursor inactivo, la protrombina. Su papel es fundamental en el proceso de la coagulación, escindiendo la molécula de fibrinógeno en monómeros de fibrina para la formación del coágulo de fibrina, para mantener la hemostasia. Por ello la trombina encuentra aplicaciones terapéuticas como agente hemostático local y como componente de los adhesivos de fibrina (compuestos mayoritariamente por fibrinógeno y trombina como principios activos).

15 La trombina utilizada tradicionalmente ha sido de origen animal (bovina o equina). Estas preparaciones han sido, en muchos casos, origen de reacciones inmunológicas debidas a la sobrecarga de proteínas heterólogas. En los últimos años se ha procedido a la purificación de trombina humana, a partir de plasma humano, con grados de purificación relevantes; y más recientemente se ha posibilitado la obtención de trombina humana de origen recombinante, a escala industrial, con una actividad idéntica a la de la trombina de origen plasmático [Biochem. (Tokyo) 2004 May;135(5):577-582] o incluso de origen transgénico.

20 Las soluciones de trombina purificada, cualquiera que sea su origen, plantean problemas de estabilidad tanto en las etapas finales del proceso de producción como en su almacenamiento para comercialización (estabilidad de producto final), pudiéndose dar una pérdida importante de actividad si no se estabiliza adecuadamente.

25 Por otra parte la trombina, como producto de origen biológico, debe ser sometida a etapas específicas de eliminación de agentes patógenos, asociados al material de partida en el caso de origen plasmático o asociados a los medios de cultivo en productos recombinantes o a los organismos productores en producto transgénico. La tendencia actual es la inclusión de al menos dos etapas complementarias de eliminación de virus.

30 Entre los métodos de reducción de la carga viral utilizados en los procesos de purificación de proteínas plasmáticas cabe destacar, por su amplia utilización y contrastada eficiencia:

35 - Tratamientos térmicos. Presentan un potencial reductor de la carga viral efectivo tanto para los virus envueltos como para los no envueltos. Su eficiencia está directamente relacionada con la estabilidad térmica de la proteína y estabilizante adicionado, debiendo evitar además alteraciones en la molécula de proteína que induzcan la formación de neoantigenicidad. [CPMP /Note for guidance on plasma derived products (CPMP/BWP/269/95rev. 3) January 2001].

40 - Tratamientos con solventes orgánicos (OSD). Por su gran eficiencia en la inactivación de los virus con cubierta lipídica es un tratamiento de amplia utilización y que puede considerarse de referencia para estos tipos de virus. Por el contrario no tienen efecto sobre los virus sin cubierta lipídica, como los Parvovirus y Virus de la Hepatitis A [Burnouf T. Blood Reviews (2000) 14, 94-110; Martinowitz U. Curr. Opin. Hematol. (1996) 3, 395-402].

45 - La filtración de soluciones a través de filtros de un tamaño de poro capaz de retener partículas víricas es un método cuya utilización se ha extendido en los últimos años ya que es un procedimiento físico que en principio no presenta capacidad potencial para alterar la estructura de las proteínas y si una eficiente capacidad de eliminación de la carga viral, en función del tamaño de poro empleado. Este tamaño de poro vendrá especialmente condicionado por la dimensión espacial de la molécula de proteína a filtrar (que debe atravesar el filtro). La filtración por filtros de 15 nm puede garantizar una reducción significativa de los virus no envueltos de pequeño tamaño, como el virus de la Hepatitis A y el Parvovirus, comprendidos entre los 20 y 30 nm. La posibilidad de realizar una filtración en serie por dos filtros de 15 nm incrementaría los niveles de reducción de la carga viral y con ello el nivel de seguridad frente a estos virus. Si esta nanofiltración se lleva a cabo en una etapa final, que evite operaciones posteriores de concentración y ajuste de composición de la solución, se anula la posibilidad de una contaminación accidental del producto nanofiltrado.

55 Se pueden citar además los siguientes documentos:

La patente ES 2108738 (Michalski), que describe un procedimiento de preparación de trombina, establece una formulación que combina el tampón gluconato con 2 g/l de albúmina, 5 g/l de sacarosa y 60 mM de CaCl<sub>2</sub>, indicando que la albúmina, la sacarosa y el calcio son esenciales para la estabilización durante la manipulación en solución (estabilidad 24 horas), la congelación y posterior liofilización.

60 La solicitud PCT WO 99/23111 (Haemacure), que describe un proceso de obtención de fibrinógeno y de trombina como componentes de un adhesivo de fibrina, especifica que es esencial para preservar la actividad de trombina la adición de albúmina inmediatamente después de elución. La concentración de albúmina añadida para la estabilización y formulación es del 2 %.

65

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han desarrollado un procedimiento de preparación de una composición de trombina que comprende trombina purificada, en la que la trombina purificada tiene una actividad específica igual o mayor a 1500 UI de trombina/mg de proteína y una potencia igual o mayor a 500 UI de trombina/ml, se estabiliza por adición y mezcla con albúmina humana y una sal neutra que es cloruro sódico, en la que la concentración de albúmina humana en la composición de trombina previa a la nanofiltración es de entre 0,05 y 1% (p/v) y la concentración de cloruro sódico en la composición de trombina previa a la nanofiltración es de al menos 0,05 molar y el pH entre 5,0-8,5, subsecuentemente aplicando a la solución una doble nanofiltración en serie por filtros de tamaño de poro nominal de 15 nm, en la que la composición de trombina es nanofiltrada con buena productividad hasta más de 15 millones de UI de trombina por m<sup>2</sup> y una recuperación de trombina de más del 90%, en la que el material nanofiltrado no requiere de posterior tratamiento para ajuste de la composición final, evitando cualquier riesgo de contaminación cruzada.

En esta composición de trombina, la albúmina actúa como estabilizante y preserva la actividad de trombina durante la manipulación en líquido, en el proceso de nanofiltración, así como durante la liofilización o congelación. Asimismo, la albúmina tiene efecto como amortiguadora de pH y da compactación a la pastilla liofilizada. En cuanto a la sal neutra, como el cloruro sódico, actúa solubilizando la trombina y mantiene la isotonía de la solución, ya que a baja fuerza iónica la trombina es muy insoluble y precipita.

El efecto amortiguador de pH y también el de compactación y solubilización del liofilizado puede complementarse mediante la adición de un agente solubilizante y/o un amortiguador de pH, como la glicina, el citrato o el acetato sódicos.

Los inventores han determinado que son necesarias concentraciones de albúmina superiores al 0,05%, y la presencia de cloruro sódico. La concentración de cloruro sódico debe ser al menos 0,05 molar, y mejor aún si es aproximadamente isotónica ó 0,15 molar. De esta forma la solución de trombina puede ser doblemente nanofiltrada por filtros de tamaño de poro nominal de 15 nm, con buena productividad (hasta 15 millones de UI de trombina por m<sup>2</sup> de área de nanofiltración, o carga superior) y sin observarse pérdidas significativas de actividad (recuperación de trombina > 90%). El material nanofiltrado se esteriliza por membrana de 0,2 µm y se dosifica asépticamente en envase apropiado (viales, botellas, jeringas, etc.) y se congela a ≤ -18°C para su posterior liofilización, o bien su conservación en el propio estado congelado. En este último caso, es posible el ajuste de la fórmula mediante la adición de una solución de cloruro cálcico a la trombina antes de congelar, sin que por ello quede afectada su estabilidad.

Esta solución de trombina se aplica a un sistema de doble nanofiltración de tamaño de poro nominal de 15 nm. El tipo de nanofiltro utilizado se comercializa con la denominación Planova 15N<sup>®</sup> (de Asahi-Kasei) y se halla en la configuración de cartucho de fibra hueca, de celulosa regenerada, con diferentes áreas de filtración. En las condiciones específicas de formulación es posible llevar a cabo la doble nanofiltración de forma simultánea mediante la conexión en serie de los dos nanofiltros, de forma que el filtrado del primero alimenta al segundo y sin que por ello se alteren las condiciones de nanofiltración recomendadas por el fabricante de dichos nanofiltros, que corresponden a una presión diferencial positiva inferior a 1,0 bar y preferentemente entre 0,2 bar y 1,0 bar, en cada nanofiltro. La capacidad de nanofiltración por filtro puede ser superior a los 30 l/m<sup>2</sup>, aunque para conseguir una eficiente reducción de los virus más diminutos (parvovirus) se aplica preferentemente no más de 30 litros de solución por m<sup>2</sup>, y más preferentemente entre 5-30 l/m<sup>2</sup>.

El líquido nanofiltrado puede dosificarse a la potencia nominal de aproximadamente 500 UI/ml sin manipulación adicional puesto que ya se encuentra ajustado a la fórmula final, sea para su liofilización o posterior congelación.

Para el ajuste de la fórmula final es posible, cuando se requiera, la adición de, por ejemplo, aminoácidos, como la glicina a una concentración entre el 0,01 y 0,1 Molar, de sales de ácidos carboxílicos, como el citrato o el acetato sódicos a una concentración de, por ejemplo, 10 mM y de cloruro cálcico o sales equivalentes (habitualmente entre 20 y 60 mM). La formulación resultante sigue siendo nanofiltrable y estable durante este proceso.

El producto obtenido es estable tanto liofilizado como congelado, durante largo período de tiempo. El liofilizado incluso puede opcionalmente someterse a inactivación vírica por calor a alta temperatura y corto período de exposición, por ejemplo durante 0,5-8 horas entre 90-115°C, y preferentemente 1-2 horas a aproximadamente 100°C.

En esta composición la trombina se ha ajustado a una potencia nominal igual o superior a 500 UI de trombina por ml de solución y la albúmina humana se ajusta a una concentración superior al 0,05% (p/v) y preferentemente entre el 0,1% y 1% (p/v). La concentración de cloruro sódico debe ser al menos 0,05 molar, y mejor aún si es aproximadamente isotónica ó 0,15 molar.

Esta composición de trombina puede ser filtrada por doble nanofiltro en serie hasta un tamaño de poro nominal igual o inferior a 35 nm y preferentemente 15 nm, pudiendo filtrarse hasta 30 litros de solución por m<sup>2</sup> de área de filtración de cada nanofiltro.

Esta composición de trombina, liofilizada, puede ser tratada por calor en seco durante ½ hora a 8 horas entre 90-115 °C, y preferentemente durante 1-2 horas a 100 °C.

A continuación se revelan varios ejemplos no limitativos de la invención.

Ejemplo 1:

- 5 Una trombina purificada (lote T-1006) con una actividad específica >1500 UI/mg de proteína total, se dializó por membranas de ultrafiltración de 10 kDa frente a unos 5 volúmenes de una solución que contenía NaCl 75 mM, glicina 50 mM y acetato sódico 10 mM a pH 6,5, concentrándose al final a 654 UI de trombina/ml de solución. Posteriormente se estabilizó por adición de albúmina humana (Albúmina Grifols 20%) hasta el 0,25%.
- 10 La solución así estabilizada se congeló a <-20°C hasta iniciar las pruebas de nanofiltración. Se estudió el efecto de la prefiltración (clarificación) previa sobre la doble nanofiltración hasta 15 nm de tamaño de poro nominal, empleando nanofiltros de celulosa regenerada cupramonio (Planova 15N<sup>®</sup>, de Asahi-Kasei). Para ello se descongelaron tres alícuotas de la solución estabilizada en un baño de agua a 20±2 °C de forma que la temperatura del producto al final se hallaba entre 2-8°C, la actividad de trombina entre 591,0 y 614,5 UI/ml, y la proteína total entre 2,54 y 2,80 mg/ml. Se procedió a prefiltrar
- 15 independientemente las soluciones por 3 tipos de filtro de diferente tamaño de poro: 0,22 µm (PVDF, de Millipore), 0,1 µm (PVDF, de Pall Corp.) y 35 nm (celulosa regenerada-cupramonio, Planova 35N<sup>®</sup> de Asahi-Kasei); y posteriormente por doble nanofiltro de 15 nm (2 x Planova 15N<sup>®</sup> de 0,001 m<sup>2</sup>) de forma simultánea, efectuándose un post-lavado final con el equivalente a un 20-28% del volumen inicial de producto. Se comprobó la viabilidad del proceso y el efecto de la prefiltración en cuanto a la relación de aplicación obtenida (kg/m<sup>2</sup>), evolución o incremento de la presión transmembrana (TMP) durante
- 20 la nanofiltración, proteína total, actividad de trombina y su recuperación.

Las condiciones de la prueba y los resultados obtenidos son los siguientes:

DOBLE NANOFILTRACIÓN POR 15 nm (2 x PLANOVA 15N)			
Tipo de prefiltrado previo	35 nm	0,1 µm	0,22 µm
Relación de aplicación (kg/m <sup>2</sup> )	30,01	30,15	30,02
TMP del 2º Planova 15N (bar)	0,20-0,85	0,20-0,95	0,20-0,80
Caudal de filtración (kg/h/m <sup>2</sup> )	3,36	3,80	3,69
Tiempo de filtración	11 h 31 min.	9 h 10 min.	9 h 43 min.
Proteína de filtrado (mg/ml)	2,33	2,62	2,52
Actividad del filtrado (UI/ml)	442,5	504,6	470,0
Recuperación de actividad (%)	99,0	99,3	96,9

- 25 Del estudio se deduce que la prefiltración del material formulado, previamente congelado a <-20°C, no tiene ningún efecto diferencial sobre la doble nanofiltración por 15 nm dentro del rango estudiado de 0,22 µm a 35 nm de tamaño de poro, en cuanto a incremento de TMP durante la nanofiltración para una relación de aplicación y caudal de filtrado aproximadamente iguales. Tampoco existen diferencias significativas en cuanto a proteína, actividad y % de recuperación entre las pruebas realizadas. Asimismo, se demuestra la viabilidad de la doble nanofiltración por 15 nm con la fórmula de producto
- 30 desarrollada conteniendo trombina altamente purificada y albúmina, además de cloruro sódico, glicina y acetato sódico, con valores de relación de aplicación > 30 kg/m<sup>2</sup> y recuperaciones superiores al 96%, en todos los casos.

Ejemplo 2:

- 35 Se estudió la posibilidad de someter el producto final desecado por liofilización a un tratamiento térmico a muy alta temperatura y corta exposición. Partiendo del mismo lote de producto purificado se procedió a la formulación en dos composiciones distintas: Fórmula A: aprox. 500 UI/ml de trombina de proteína, albúmina al 1%, acetato sódico 10 mM y cloruro sódico 75 mM. Fórmula B: aprox. 500 UI/mL de trombina, manitol al 2%, histidina 10 mM, PEG-3350 a 0,03%, y cloruro sódico 175 mM.
- 40 Las composiciones fueron nanofiltradas por 15 nm, y el producto nanofiltrado se liofilizó en viales de 10 ml, efectuándose una desecación final de 24 h a 37°C en condiciones de vacío máximo del equipo (<0,1 mbar) quedando una humedad residual inferior al 1%.
- 45 Los viales obtenidos se sometieron a tratamiento térmico a temperaturas de 100 °C, 105 °C, 110 °C y 115 °C, durante períodos de ½ h, 1 h, 2 h, 4 h y 8 h, determinándose posteriormente la actividad de trombina. Los porcentajes de recuperación de actividad respecto al producto inicial sin someter a tratamiento térmico se muestran a continuación.

ES 2 845 143 T3

Temperatura (°C)	Horas de exposición	Recuperación de actividad (%)	
		Fórmula A	Fórmula B
Liofilizado Sin Calentar	---	100	100
100	1	104	24
	2	91	22
	4	85	-
	8	67	-
105	½	107	19
	1	103	-
	2	99	-
	4	92	-
110	½	102	-
	1	89	-
	2	89	-
	4	78	-
115	½	101	-
	1	104	-
	2	75	-
	4	66	-

Los resultados mostrados en la tabla anterior ponen de relieve el efecto termo-protector de la albúmina y se deduce que es posible calentar hasta aproximadamente un máximo de 4 horas a temperatura de 100-105 °C, 2 horas a 110°C y 1 hora a 115°C, con una recuperación de actividad del 90±5% ó superior.

5 Ejemplo 3: Con objeto de evaluar la estabilidad del producto liofilizado se realizan las siguientes preparaciones de producto final.

Preparación	Actividad de Trombina (UI)	Volumen dosificación/regeneración (ml)	Albúmina (%)	Cloruro Sódico (M)	Glicina (M)
119392 131294 131992	10000	20	0,25	0,15	0,05

10 Estas preparaciones se almacenaron a 5 y 30 °C y muestras de ellas se analizaron a diferentes períodos de tiempo, no observándose signos de inestabilidad en los parámetros analizados y obteniendo las siguientes recuperaciones de actividad (%):

Preparación	Valor inicial	3 meses		6 meses		9 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
		5°C	30°C	5°C	30°C	5°C	30°C	5°C	30°C	5°C	30°C	5°C	30°C
119392	100%	109,4	99,8	95,6	93,9	94,1	92,6	94,6	84,5	105,7	91,8	100,1	92,4
131294		87,7	86,5	86,8	83,1	79,0	80,5	94,5	84,1	97,4	85,1	104,3	84,1
131992		95,2	90,3	89,2	76,0	93,4	79,0	103,1	80,5	103,7	88,9	102,5	79,0

Ejemplo 4: Con objeto de evaluar la estabilidad del producto congelado se realizan las siguientes preparaciones de producto final.

Preparación	Trombina (UI)	Volumen (ml)	Albúmina (%)	Cloruro Sódico (M)	Glicina (M)	Cloruro Cálcico (mg)
219390	500	1	0,25	0,15	0,05	5,88
232592						
302493						

ES 2 845 143 T3

Preparación	Trombina (UI)	Volumen (ml)	Albúmina (%)	Cloruro Sódico (M)	Glicina (M)	Cloruro Cálculo (mg)
219391	1500	3	0,25	0,15	0,05	17,64
232593						
302492						
232594	2500	5	0,25	0,15	0,05	29,4
302491						
306591						

Estas preparaciones se almacenaron a -18 °C y muestras de ellas se analizaron a diferentes períodos de tiempo, no observándose signos de inestabilidad en los parámetros analizados y obteniendo las siguientes recuperaciones de actividad (%):

5

	Valor inicial	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
219390	100%	100,8	102,8	96,7	113,5
232592		96,1	99,5	99,5	nd
302493		99,2	93,4	91,1	nd
219391		95,9	102,0	108,9	113,6
232593		99,1	101,3	100,4	nd
302492		100,0	92,0	89,1	nd
232594		102,3	103,7	100,9	nd
302491		94,1	92,2	88,3	nd
306591		92,8	91,9	nd	nd
(nd: no determinado)					

De algunas de estas preparaciones se ha estudiado además la estabilidad en solución a 5 y 25 °C, no observando signos de inestabilidad en los parámetros analizados y obteniendo las siguientes recuperaciones de actividad (%):

	Valor inicial	12 horas		24 horas		48 horas		72 horas	
		5°C	25°C	5°C	25°C	5°C	25°C	5°C	25°C
232592	100%	105,6	99,2	107,4	103,6	97,4	97,2	107	96,8
302493		99,8	97,9	91,5	88,2	88,4	88,4	92,3	84,9
302491		97,1	95,6	93,0	97,1	99,3	87,2	102	4,9
306591		93,1	89,3	93,8	89,3	95,3	93,6	93,6	88,9

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para la preparación de una composición de trombina que comprende trombina purificada, en la que la trombina purificada tiene una actividad específica igual o mayor a 1500 UI de trombina/mg de proteína y una potencia igual o mayor a 500 UI de trombina/ml, se estabiliza por adición y mezcla con albúmina humana y una sal neutra que es cloruro sódico, en la que la concentración de albúmina humana en la composición de trombina previa a la nanofiltración es de entre 0,05 y 1% (p/v) y la concentración de cloruro sódico en la composición de trombina previa a la nanofiltración es de al menos 0,05 molar y el pH entre 5,0-8,5, subsecuentemente aplicando a la solución una doble nanofiltración en serie por filtros de tamaño de poro nominal de 15 nm, en la que la composición de trombina es nanofiltrada con buena productividad hasta más de 15 millones de UI de trombina por m<sup>2</sup> y una recuperación de trombina de más del 90%, en la que el material nanofiltrado no requiere de posterior tratamiento para ajuste de la composición final, evitando cualquier riesgo de contaminación cruzada.
- 10
- 15 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque la albúmina humana tiene una concentración previa a la nanofiltración entre 0,1% y 1% (p/v).
- 20 3. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por someter la solución a proceso de congelación.
- 25 4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por someter la solución a liofilizado.
5. Procedimiento, según la reivindicación 4, caracterizado porque el producto liofilizado es tratado por calor en seco durante un tiempo comprendido entre 30 minutos y 8 horas a una temperatura comprendida entre 90 °C y 115°C.
6. Procedimiento, según la reivindicación 5, caracterizado porque la composición de trombina liofilizada es tratada por calor seco durante un tiempo de 1-2 horas a 100°C.

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- ES 2108738
- WO 9923111 A

**Literatura no patente citada en la descripción**

- *Biochem. (Tokyo)*, May 2004, vol. 135 (5), 577-582
- **BURNOUF T.** *Blood Reviews*, 2000, vol. 14, 94-110
- *CPMP /Note for guidance on plasma derived products (CPMP/BWP/269/95rev. 3)*, January 2001
- **MARTINOWITZ U.** *Curr. Opin. Hematol.*, 1996, vol. 3, 395-402