



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0610339-1 A2**



* B R P I O 6 1 0 3 3 9 A 2 *

(22) Data de Depósito: 25/05/2006
(43) Data da Publicação: 22/06/2010
(RPI 2059)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 38/00

(54) Título: **METÓDO PARA PREPARAR TROMBINA BOVINA RECUPERADA, E, MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE TROMBINA BOVINA PURIFICADA**

(30) Prioridade Unionista: 26/05/2005 US 11/140,374, 24/05/2006 US 11/440,678, 24/05/2006 US 11/440,678, 26/05/2005 US 11/140,374

(73) Titular(es): King Pharmaceuticals Research & Development, INC

(72) Inventor(es): ABDEL HAK TERRAB, BRADLEY H. KNOLL, DAN PAWLAK, FOSTER IRWIN, GERALD CHESMORE

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2006020412 de 25/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/127990 de 30/11/2006

(57) Resumo: A invenção refere-se a composições de trombina com reduzidos níveis de impurezas de elevado peso molecular. Em particular, os níveis do fator Va, prions e/ou agentes virais são grandemente reduzidos. Esta invenção também refere-se genericamente a métodos para a preparação de trombina tendo um alto grau de pureza e elevada atividade específica. Mais especificamente, a invenção abrange etapas para excluir impurezas de elevado peso molecular das preparações de trombina por filtragem de exclusão de tamanho. Em formas de realização adicionais, a preparação da trombina adicionalmente inclui uma etapa de filtragem de troca de ions. Os métodos da invenção são particularmente adequados para purificação de larga escala de trombina. Esta invenção também refere-se genericamente a formulações estabilizadas contendo composições de trombina. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a formulações líquidas estabilizadas contendo trombina tendo um alto grau de pureza e alta atividade específica e a métodos de produzir e utilizar tais formulações.



“MÉTODO PARA PREPARAR UMA TROMBINA, COMPOSIÇÃO DE TROMBINA, FORMULAÇÃO DE TROMBINA LÍQUIDA ESTABILIZADA, MÉTODO PARA ADMINISTRAR A FORMULAÇÃO DE TROMBINA ESTABILIZADA, E, KIT”

5 Este pedido é uma continuação em parte do Pedido de Patente dos Estados Unidos No. 11/140.374, depositado em 26 de maio de 2005, incorporado aqui por referência em sua totalidade. Este pedido incorpora por referência, em sua totalidade, o Pedido de Patente dos Estados Unidos de continuação em parte intitulado “Thrombin Purification”, depositado em 24
10 de maio de 2006. Este pedido reivindica prioridade para o Pedido de Patente dos Estados Unidos No. 11/140.374, depositado em 26 de maio de 2005 e para o Pedido de Patente dos Estados Unidos de continuação em parte intitulado “Thrombin Purification”, depositado em 24 de maio de 2006.

1. CAMPO DA INVENÇÃO

15 A invenção refere-se genericamente a preparações de trombina purificada, substancialmente livres de impurezas de grande peso molecular, tais como fator Va, príons e/ou agentes virais, que contribuem para efeitos adversos nos pacientes. Esta invenção também refere-se a métodos para a preparação de trombina substancialmente livre de agentes virais, tendo um
20 alto grau de pureza e alta especificidade específica. Mais particularmente, a invenção abrange métodos compreendendo a exclusão de impurezas de elevado peso molecular de preparações de trombina. Esta invenção também refere-se genericamente a formulações de preparações de trombina tendo um alto grau de pureza.

25 2. FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A trombina é uma enzima protolítica, que aparece no sangue em seguida à ativação do sistema de coagulação, como resultado da proteólise da protrombina. A trombina facilita a coagulação do sangue pela catalisador da conversão do fibrinogênio em fibrina, que forma os coágulos sangüíneos e

libera fibrinopeptídeos A e B. Em seguida a uma perturbação do sistema vascular, a produção de trombina é central ao processo de coagulação.

5 A preparação de trombina foi aprovado pela FDA para ser aplicada topicamente como um auxiliar da homeostase, sempre que sangue vertendo ou sangramento menor dos capilares e pequenas vênulas for acessível. A aplicação tópica da trombina comercialmente disponível acelera significativamente a coagulação do sangue e significativamente reduz os tempos de coagulação.

10 Estudos utilizando formulações de trombina de alta pureza indicam que podem ocorrer coagulopatias em pacientes, em resposta à exposição a formulações de trombina tópicas, de baixa pureza. As impurezas tipicamente presentes em preparações de trombina comercialmente disponíveis incluem fator Va, albumina de soro bovino (BSA) e outras proteínas de elevado peso molecular. A contaminação do Fator Va de 15 formulações de trombina bovina comerciais pode estimular a produção de anticorpos Va de fator anti-bovino do paciente, que pode reagir cruzadamente com o próprio fator Va do paciente, desse modo resultando em hemostase prejudicada.

20 A intensidade de coagulação sangüínea da trombina é medida em unidades/ml. Quanto mais concentrada a amostra for, maior a potência, mais rápido ela coagulará o sangue (ou criará fibrinogênio). A atividade específica é uma relação da potência de uma amostra, dividida por seu teor de proteína e é expressa em unidades por miligrama de proteína.

25 A atividade da trombina específica é dependente da pureza da trombina. A trombina altamente purificada apresenta um aumento da atividade específica, quando comparada com uma preparação menos pura.

Anteriormente, a purificação da trombina era genericamente limitada ao uso de cromatografia por troca de íons convencional. A Patente U.S. No. 5.397.704 descreve uma preparação bovina da trombina que é

preparada utilizando-se uma série de cromatografia por troca de ânion e cátion.

5 A Patente U.S. No. 5.151.355 descreve uma preparação de trombina bovina, que é preparada reagindo-se uma unidade de protrombina com menos do que 5 unidades de tromboplastina na presença de cálcio. A trombina é então aplicada seqüencialmente a uma coluna de agarose de troca de ânions e uma coluna de agarose de troca de cátions.

10 A Patente U.S. No. 4.965.203 descreve um método de purificar trombina bovina, em que a trombina é passada através de uma série de colunas de cromatografia por troca de íons e então formulada com um polioliol e tampões. Embora as preparações de trombina acima sejam alegadas terem alta atividade específica, tais esquemas de purificação não fornecem quaisquer meios para efetivamente eliminar impurezas de elevado peso molecular.

15 A Publicação de Pedido de Patente dos Estados Unidos No. 2001/0033837 descreve um método de purificar uma preparação de trombina empregando-se cromatografia por interação hidrofóbica, opcionalmente seguida por cromatografia por troca de cátions. Embora o método de purificar trombina inclua cromatografia por interação hidrofóbica, o método descrito
20 para purificação e remoção do vírus não é capaz de conseguir a remoção do vírus e a atividade ou pureza específicas abrangidas pela presente invenção.

Desta maneira, há necessidade de métodos que possam ser usados para produzir trombina tendo um mais elevado grau de pureza. A trombina purificada terá níveis mais baixos de impurezas de elevado peso
25 molecular, tais como fator Va e uma alta margem de depuração dos agentes e príons virais.

Embora a trombina tendo um alto grau de pureza possa ser de uso mais seguro, uma vez que as impurezas tais como fator Va e BSA são reduzidos ou eliminados, a trombina altamente purificada é de difícil

formulação em formulações estabilizadas. Quanto mais pura for a trombina, menos estável ela é e de mais difícil formulação em formulações estabilizadas. Portanto, permanece a necessidade de formulações estabilizadas contendo trombina tendo um alto grau de pureza e elevada atividade específica.

3. BREVE RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção é dirigida a composições de trombina e métodos de preparar essas composições. Como aqui usados, os termos formulação, composição e preparação podem ser usadas intercambiavelmente.

10 As formulações, composições e preparações contempladas pela invenção contêm trombina, preferivelmente trombina tendo aumentada pureza e podem também conter excipientes adicionais, em particular aqueles que fornecem estabilidade à formulação, composição ou preparação.

15 Em uma forma de realização, a presente invenção compreende um método para preparar uma trombina tendo uma elevada atividade específica, aumentada pureza e é substancialmente livre de impurezas, incluindo partículas virais, fator Va e príons. De acordo com a presente invenção, os métodos para a preparação de trombina tendo aumentada impureza podem incluir uma ou mais das seguintes etapas: filtragem de
20 exclusão de tamanho, troca de íons ou cromatografia por exclusão de tamanho, tratamento térmico, ajuste de pH e radiação eletromagnética. Na presente invenção, a fonte de trombina pode ser bovina ou humana.

25 Em ainda outra forma de realização, o método da presente invenção é capaz de reduzir impurezas na preparação em pelo menos 50%, quando comparada com preparações comercialmente disponíveis, tais como Trombina-JMI[®]. Mais preferivelmente, o método da presente invenção é capaz de reduzir impurezas na preparação da trombina em pelo menos 80%, quando comparada com a trombina bovina pré-purificada ou de baixa pureza, como aqui descrito. De acordo com outra forma de realização da presente

invenção, o método é capaz de aumentar a atividade específica de uma preparação de trombina em pelo menos 1000%, 1200% ou 1500%, quando comparada com trombina bovina pré-purificada ou de baixa pureza, como descrito aqui.

5 De acordo com a presente invenção, a etapa de filtragem de exclusão de tamanho é usada para excluir impurezas que tenham um peso molecular maior do que 40 kDa. Preferivelmente, o filtro de exclusão de tamanho é usado para excluir impurezas que tenham uma pesos moleculares variando de 40 kDa a 300 kDa. Mais preferivelmente, o filtro de exclusão de
10 tamanho tem um corte de peso molecular variando de 50 kDa a 150 kDa. Em outra forma de realização da invenção, o filtro de exclusão de tamanho tem um corte de peso molecular de 50 kDa. Em outra forma de realização, o filtro de exclusão de tamanho tem um peso molecular de 100 kDa.

O método da presente invenção pode também incluir a
15 aplicação de uma preparação de trombina a mais etapas de cromatografia, tais como uma cromatografia por troca de íons e/ou cromatografia por exclusão de tamanho.

Em outra forma de realização, o método da presente invenção compreende aplicar um tratamento térmico a uma preparação de trombina.
20 Preferivelmente, o tratamento térmico inclui manter a trombina a 60°C por 10 horas.

Em outras forma de realização, o método da presente invenção compreende baixar o pH de uma preparação de trombina a cerca de 5 ou menos.

25 Em ainda outra forma de realização, o método da presente invenção compreende a aplicação de radiação eletromagnética a uma preparação de trombina. A radiação eletromagnética pode ser radiação gama ou radiação UV.

A presente invenção abrange um método de preparação de

grande escala de trombina tendo aumentada pureza, compreendendo aplicar pelo menos 15 L de uma preparação de trombina a um filtro de exclusão. Em uma forma de realização preferida, a presente invenção é dirigida a um método para preparação de larga escala de trombina tendo aumentada pureza, compreendendo aplicar pelo menos 15 L de uma preparação de trombina a um filtro de exclusão de tamanho em que os 15 L da preparação de trombina compreende cerca de 300.000.000 unidades de trombina.

A presente invenção é também dirigida a uma composição de trombina. Em uma forma de realização, a composição de trombina é substancialmente livre de impurezas. Em outra forma de realização, a composição de trombina é substancialmente livre de impurezas tendo um peso molecular maior do que 40 kDa. Preferivelmente, a composição de trombina é substancialmente livre de impurezas tendo um peso molecular entre 40 kDa e 300 kDa.

Em ainda outra forma de realização, a composição de trombina da presente invenção é substancialmente pura. Preferivelmente, a composição de trombina é substancialmente livre do fator Va. Mais preferivelmente, o fator Va está presente a menos do que 0,4 µg/1000 unidades de trombina. Adicionalmente, a quantidade de fator Va pode ser medida por ensaio de atividade do fator Va, ELISA, ou Western Blot.

Em outra forma de realização da presente invenção, a composição de trombina tem atividade específica maior do que 1800 u/mg de proteína e é substancialmente livre de impurezas tendo um peso molecular maior do que 40 kDa. A composição de trombina da presente invenção pode ter uma atividade específica entre cerca de 1800 e 3000 u/mg de proteína. Preferivelmente, a composição de trombina pode ter uma atividade específica entre cerca de 2400 e 2500 u/mg de proteína ou entre cerca de 2500 e 2600 u/mg de proteína, entre cerca de 2600 e 2700 u/mg de proteína, entre cerca de 2700 e 2800 u/mg de proteína, entre cerca de 2800 e 2900 u/mg de proteína

ou entre 2900 e 3000 u/mg de proteína. Adicionalmente, a composição de trombina pode ter uma atividade específica maior do que 3000 u/mg de proteína.

5 A presente invenção é também dirigida a uma composição de trombina substancialmente livre de agentes virais. A composição de trombina da presente invenção pode ser substancialmente livre de agentes virais, em que o valor de redução em log é maior do que 3,5 por vírus.

10 A presente invenção é também dirigida a formulações estabilizadas, compreendendo trombina tendo um alto grau de pureza e alta atividade específica e métodos de produzir e utilizar tais formulações. Mesmo embora a estabilidade das formulações possa diminuir à medida que a pureza da trombina aumenta, os inventores descobriram formulações estabilizadas compreendendo trombina, tendo um alto grau de pureza e alta atividade específica.

15 As formulações de trombina estabilizadas da presente invenção com compreendem trombina e pelo menos um excipiente farmacologicamente aceitável.

20 As formulações estabilizadas da presente invenção podem conter trombina isolada de qualquer fonte, incluindo mas não limitado a fontes bovinas e humanas. Adicionalmente, a trombina pode ser qualquer preparação ou composição de trombina, tal como as composições de trombina purificadas da presente invenção ou a Thrombin JMI[®] atualmente comercialmente disponível. Em uma forma de realização preferida, a trombina tem um alto grau de pureza e alta atividade específica.

25 Além da trombina, as formulações de trombina estabilizadas da presente invenção incluem um excipiente. Em certas formas de realização, os excipientes adequados para as formulações da presente invenção incluem mas não são limitados a glicerol; polietileno glicol; sais; soluções aquosas, tais como água, ácidos e bases ou uma combinação dos mesmos.

Sais preferidos incluem mas não são limitados a cloreto de sódio, acetato de sódio, citrato de sódio ou uma combinação dos mesmos.

Ácidos e bases adequados incluem mas não são limitados a ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Preferivelmente, as formulações da presente invenção têm um pH de 5-9 ou, mais preferivelmente, um pH de 6-8.

Preferivelmente, as formulações de trombina estabilizadas da presente invenção compreendem 20-40% em volume de glicerol, 1-20% em volume de polietileno glicol, concentração de 0,15-0,3 M de cloreto de sódio e concentração de 0,025-0,05 M de acetato de sódio.

Em uma forma de realização preferida da presente invenção, as formulações de trombina estabilizadas da presente invenção compreendem trombina purificada; glicerol; polietileno glicol; cloreto de sódio; acetato de sódio e um pH de 6-8.

Em certas formas de realização, as formulações de trombina estabilizadas da presente invenção são líquidas. Alternativamente, as formulações de trombina estabilizadas da presente invenção podem ser sólidas, em que, antes da administração, a formulação de trombina sólida, estabilizada, é dissolvida ou suspensa em um líquido.

Adicionalmente, a presente invenção é também dirigida a métodos de administrar as formulações de trombina estabilizadas da presente invenção. Preferivelmente, as formulações de trombina estabilizadas da presente invenção são administradas topicamente ou à superfície de um lume corporal.

A presente invenção é também dirigida a kits compreendendo as formulações de trombina estabilizadas da presente invenção. Em certas formas de realização da invenção, os kits compreendem formulação de trombina estabilizada; um frasco capaz de conter a formulação de trombina; e um agulha.

Em outras formas de realização da invenção, os kits

compreendem uma formulação de trombina e um dispositivo que é capaz de pulverizar a formulação de trombina. Dispositivos de pulverização adequados incluem mas não são limitados a uma ponta de spray ou uma bomba de spray.

A presente invenção é dirigida a formulações de trombina estabilizadas, que mantêm pelo menos 60% de sua potência inicial, por um período de dois anos. Em formas de realização preferida, as formulações mantêm pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% de sua potência inicial. A invenção é particularmente dirigida a formulações que mantenham pelo menos 80%, 85%, 90%, ou 95% da sua potência inicial após 3 meses, pelo menos 70%, 80%, 85%, ou 90%, 95% de sua potência inicial após 6 meses, pelo menos 70%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de sua potência inicial após 9 meses, pelo menos 70%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de sua potência inicial após 12 meses, e pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de sua potência inicial após 18 meses. A presente invenção é também dirigida a formulações de tablete estabilizadas, que mantenham pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de potência de reivindicação de rótulo inicial por um período de dois anos. A invenção é dirigida a formulações que mantenham pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de sua potência de rótulo inicial após 3 meses, pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de sua potência de rótulo inicial após 6 meses, pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de sua potência de rótulo inicial após 9 meses, pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% of sua potência de rótulo inicial após 12 meses, pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de sua potência de rótulo inicial após 18 meses.

25 4. BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 mostra um fluxograma de todas as etapas usadas para preparar uma preparação de trombina, de acordo com o método da presente invenção.

A Figura 2 mostra uma comparação de Eletroforese de Gel de

Poliacrilamida de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) da Thrombin-JMI[®], após a adição do processo de purificação da presente invenção (alamedas, 7, 8 e 9) à Trombina-JMI[®], como atualmente manufaturada (alamedas 4 e 5) e a retentiva da filtragem de exclusão de tamanho, mostrando as impurezas de elevado peso molecular (alameda 11).

A Figura 3 mostra um método de produzir as formulações de trombina estabilizadas da presente invenção.

5. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção é baseada na descoberta de que o uso apenas da filtragem de exclusão de tamanho ou, em combinação com outras etapas de purificação para a purificação da trombina, fornece substanciais benefícios em relação aos métodos de purificação de trombina da arte anterior. Os métodos de purificar a trombina da presente invenção fornecem trombina que é significativamente mais pura e segura, devido à substancial remoção ou eliminação de impurezas de elevado peso molecular. Os métodos da presente invenção também fornecem um alto grau de depuração viral, juntamente com consistência, confiabilidade e facilidade de uso.

A presente invenção abrange a aplicação de etapas de purificação a uma preparação de trombina e recuperação da trombina purificada. Estas etapas incluem mas não são limitadas a purificação cromatográfica; aplicação da preparação de trombina a um filtro de exclusão de tamanho; aplicação da preparação de trombina a um filtro de troca de íons; diminuição do pH; ou irradiação da preparação de trombina com radiação eletromagnética. Embora a invenção seja baseada na descoberta do uso da filtragem de exclusão de tamanho, tais etapas de purificação podem ser aplicadas independentemente ou em combinação.

Além disso, os métodos são receptivo a grande escala, produção comercial e purificação. Os métodos da presente invenção podem produzir grandes quantidades de trombina substancialmente livres de

impurezas, tendo um peso molecular maior do que 40 kDa e agentes virais.

A presente invenção também contempla a adição de um ou mais excipientes à trombina, resultando em uma formulação de trombina que é mais estável do que as formulações de trombina atualmente disponíveis.

5 Como tal, a presente invenção resolve muitos dos problemas das formulações de trombina da arte anterior. Sem ficarmos presos a qualquer teoria particular, a capacidade de estabilizar as composições de trombina altamente purificadas da presente invenção pode resultar em tratamento consistente e eficaz. Preferivelmente, as formulações de trombina estabilizadas da presente
10 invenção compreendem trombina tendo um alto grau de pureza e atividade específica e pelo menos um excipiente farmacologicamente aceitável. A presente invenção também abrange formulações de trombina estabilizadas, líquidas.

5.1 FONTE DE TROMBINA

15 A trombina de qualquer fonte pode ser usada nas composições, formulações e métodos da presente invenção. Exemplos de fontes de trombina adequada, para uso nas composições, preparações e métodos da presente invenção, incluem mas não são limitados a trombina isolada de fontes bovinas ou humanas. Fontes comerciais de trombina, tais como Thrombin JMI[®],
20 podem também ser usadas na presente invenção.

Também trombina de qualquer nível de pureza ou trombina resultando de qualquer preparação pode ser usada. Por exemplo, trombina pré-purificada, como aqui descrito, pode ser usada nas composições, formulações e métodos da presente invenção. Adicionalmente, a trombina
25 resultante de preparações naturais ou recombinantes é adequada para a presente invenção.

5.2 PURIFICAÇÃO DA TROMBINA

A presente invenção inclui métodos para a preparação de trombina com aumentada pureza, aumentada atividade específica e aumentada

segurança, devido aos baixos níveis de impureza, tais como fator Va, príons e partículas virais.

Em certas formas de realização, os métodos da presente invenção aumentam a pureza de uma preparação de trombina em mais do que 30%, mais do que 50%, mais do que 75% ou mais do que 90%, em comparação com a Thrombin-JMI[®] ou outra trombina purificada.

Outra maneira pela qual a pureza é quantificada é medindo-se a atividade específica da trombina. A atividade específica da trombina pode ser medida por ensaios padrão conhecidos na arte, incluindo ensaios de coagulação e ensaios cromogênicos (vide, p. ex., Gaffney et al., 1995, Thromb Haemost 74:900-903).

Em uma forma de realização, os métodos da invenção fornecem preparações de trombina em que a atividade específica da preparação da trombina é aumentada em pelo menos 1000%, pelo menos 1200%, pelo menos 1500%, ou pelo menos 1800%, em comparação com a trombina pré-purificada. As composições de trombina da presente invenção têm uma elevada atividade específica; Preferivelmente, a atividade específica das composições de trombina da presente invenção é maior do que 1800 u/mg de proteína.

Os métodos da presente invenção fornecem preparações de trombina tendo uma atividade específica variando de cerca de 1800 u/mg e 3000 u/mg, mais preferivelmente entre cerca de 1800 u/mg e 2400 u/mg. Em outras formas de realização, a atividade específica é entre cerca de 2400 u/mg e 2500 u/mg, entre cerca de 2500 u/mg e 2600 u/mg, ou entre cerca de 2600 u/mg e 2700 u/mg, entre cerca de 2700 e 2800 u/mg de proteína, entre cerca de 2800 e 2900 u/mg de proteína ou entre cerca de 2900 e 3000 u/mg de proteína. Em certas formas de realização, a trombina tem uma atividade específica maior do que 3000 u/g.

Empregando-se certos métodos da invenção, os agentes virais

e/ou impurezas de elevado peso molecular são reduzidos em pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99%. Em uma forma de realização preferida, as impurezas de elevado peso molecular e/ou impurezas de partículas virais da preparação de trombina são reduzidas em pelo menos 80%.

A presente invenção também fornece métodos para purificar trombina, compreendendo excluir moléculas tendo um mais elevado peso molecular do que a trombina. São providos métodos para purificar trombina para eliminar pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% e pelo menos 99% de impurezas tendo um mais elevado peso molecular do que a trombina. Ao obter-se a eliminação de impurezas de mais elevado peso molecular, é desejável obterem-se recuperações de trombina de pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99%.

Também em certas formas de realização dos métodos da presente invenção, a recuperação da trombina é também maior do que 80%, maior do que 85%, maior do que 90%, ou maior do que 95%.

Os métodos da presente invenção incluem aplicar etapas de purificação a uma preparação de trombina e recuperar a trombina purificada. As etapas de purificação da presente invenção incluem aplicar uma preparação de trombina a um filtro de exclusão de tamanho; purificação cromatográfica; aplicação da preparação de trombina a um filtro de troca de íons; diminuição do pH; ou irradiação da preparação de trombina com radiação eletromagnética. Tais etapas podem ser aplicadas independentemente ou em combinação.

5.2.1 FILTRAGEM E CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO

De acordo com os métodos da presente invenção, a

recuperação e purificação das preparações de trombina podem ser conseguidas excluindo-se as impurezas utilizando-se métodos envolvendo técnicas de separação baseadas no peso molecular. Em geral, qualquer método envolvendo separação baseada em peso molecular pode ser usada, incluindo
5 filtragem e cromatografia por exclusão de tamanho. Em certas formas de realização, em os métodos da presente invenção utilizam filtragem de exclusão de tamanho, é preferível que os poros do filtro sejam grandes o bastante para permitir a passagem das moléculas de trombina, porém bastante pequenos para reter muitas impurezas, incluindo impurezas e vírus de grandes
10 proteínas.

Uma vez que a trombina tem um peso molecular de aproximadamente 40 kDa, é preferível que, em certas formas de realização, os métodos da invenção compreendem aplicar uma preparação de trombina a um filtro de exclusão de tamanho capaz de excluir impurezas que tenham um
15 peso molecular maior do que 40 kDa de tamanho de dita preparação de trombina. Em uma forma de realização preferida, o filtro de exclusão de tamanho é capaz de excluir impurezas que tenham um peso molecular variando de 40 kDa a 300 kDa.

Assim, os filtros de exclusão de tamanho de cortes de peso
20 molecular, isto é, limite de exclusão de 50, 100, 150, 300 kDa ou maior, podem ser usados. Em uma forma de realização, o filtro de exclusão de tamanho tem um corte de peso molecular variando de 40 kDa a 300 kDa. Em outra forma de realização, o filtro de exclusão de tamanho tem um corte de peso molecular variando de 50 kDa a 300 kDa. Em ainda outra forma de
25 realização, o filtro de exclusão de tamanho tem um corte de peso molecular variando de 50 kDa a 150 kDa. Em uma forma de realização preferida, o filtro de exclusão de tamanho tem um corte de peso molecular de 50 kDa. Em uma forma de realização mais preferida, o filtro de exclusão de tamanho tem um corte de peso molecular de 100 kDa. Esta etapa pode também opcionalmente

incluir a aplicação de diafiltração, para maximizar a recuperação da trombina.

Em formas de realização preferidas, os filtros de exclusão de tamanho terão tamanhos de poro com um corte de peso molecular em torno de 5 100 kDa. Preferivelmente, o filtro de exclusão de tamanho adequado para a presente invenção também reduz eficazmente os agentes bacterianos e endotoxinas.

Em certas formas de realização, os filtro de exclusão de tamanho são feitos de polietersulfona modificada em um suporte de 10 poliolefina altamente poroso. Além disso, o filtro usado pode ser um filtro de fluxo tangencial. Um exemplo de um filtro que pode ser usado nesta invenção é o ÔmegaTM 100K VR, manufaturado pela PALL FILTRON Corporation.

Outros filtros de exclusão de tamanho que podem ser usados de acordo com a presente invenção incluem mas não são limitados ao 15 Viresolve/70, manufaturado por Millipore Corporation; VirA/Gard 500, manufaturado por A/G Technology, Corporation e Ultipor DV20, manufaturado por Pall Corporation.

Com a filtração de exclusão de tamanho, as moléculas grandes, incluindo impurezas virais, são retidas pelos poros da membrana. A 20 membrana pode ser descartada após uso ou, alternativamente, a membrana pode ser reutilizada. As membranas que resultam em uma redução em log bastante elevada são consideradas aceitáveis e podem ser usadas. Cada redução em log é uma redução de 90%. Outros testes podem também ser realizados no filtro, para assegurar que o filtro tenha uma faixa de tamanho de 25 poro aceitável. Em certas formas de realização dos métodos da presente invenção, a depuração viral é em um valor de redução em log (LRV) maior do que 3,5, preferivelmente maior do que 4,0, mais preferivelmente maior do que 4,5. Em certas formas de realização, a depuração de príon é em um valor de redução em log (LRV) maior do que 3,5, preferivelmente maior do que 4,0,

mais preferivelmente maior do que 4,5.

Em certas formas de realização da invenção, os volumes de 50 ml, 100 ml, 150 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 350 ml, 400 ml, 450 ml, 500 ml, seus múltiplos ou mais são aplicados a um filtro de exclusão de tamanho. A invenção também abrange métodos compreendendo aplicar pelo menos 300 ml de uma preparação de trombina a um filtro de exclusão de tamanho.

A invenção também abrange métodos para purificação de trombina comercial de larga escala, compreendendo aplicar pelo menos 40 l de uma preparação de trombina a um filtro de exclusão de tamanho, preferivelmente pelo menos 60 l de uma preparação de trombina a um filtro de exclusão de tamanho, muitíssimo preferivelmente pelo menos 90 l de uma preparação de trombina a um filtro de exclusão de tamanho. Em certas formas de realização, o volume da preparação de trombina aplicada ao filtro de exclusão de tamanho depende da área de superfície dos filtros usados e/ou do número de filtros usados. Em formas de realização preferidas da invenção, os volumes iniciais de 40 l a 60 l, 60 l a 80 l, 80 l a 100 l, acima de 100 l ou mais e seus múltiplos são aplicados a um filtro de exclusão de tamanho.

Os certos métodos da presente invenção são particularmente adequados a purificações de larga escala de trombina. Como tal, em formas de realização preferidas da invenção, os volumes iniciais de 15 L a 20 L e seus múltiplos são aplicados a um filtro de exclusão de tamanho. Em uma forma de realização em que 15 L de preparação de trombina são aplicados ao filtro de exclusão de tamanho, a preparação de trombina compreende 300.000.000 unidades de trombina.

25 5.2.2 CROMATOGRAFIA POR TROCA DE ÍONS

Empregada sozinha ou em conjunto com a filtração de exclusão de tamanho, a filtração de exclusão de íons também fornece substanciais benefícios à preparação de trombina. A filtração de exclusão de íons fornece um alto grau de depuração viral, juntamente com consistência,

confiabilidade e facilidade de uso.

Em certas formas de realização, os métodos da presente invenção podem ainda compreender aplicar a trombina a um filtro de troca de íons. A filtro de troca de íons é um método de separação que filtra solutos baseados em sua carga eletrônica. Os filtros de troca de íons contêm centros de carga na membrana de troca de íons. Quando a amostra é passada através do filtro, os compostos carregados na amostra adsorverão nos centros de carga da membrana. É selecionado um filtro que tem uma carga positiva e que filtrará proteína e impurezas virais carregadas da preparação de trombina. Os vírus com a mesma carga líquida que o filtro não se ligarão à resina e serão removidos na penetração.

Os filtros de troca de íons usado de acordo com a presente invenção são preferivelmente carregados positivamente, enquanto que as resinas de cromatografia por troca de íons tipicamente usadas para purificação da trombina são carregadas negativamente. Os filtros de troca de íons são eficientes para remover ácidos nucléicos. Em uma forma de realização preferida, um filtro de troca de íons tem grupos amina quaternária pendentos. Um filtro de troca de íons preferido, que pode ser usado com esta invenção, é o filtro MustangTM Q, manufaturado pela Pall Corporation. Outro filtro de troca de íons que pode ser usado é o Cuno Zeta Plus VR05.

5.2.3 TRATAMENTO TÉRMICO

A aplicação de moderado calor é também uma etapa adequada, que pode ser usada nos métodos da presente invenção para a purificação da trombina. A aplicação de calor moderado pode também ser usada sozinha ou em conexão com a filtração ou cromatografia por exclusão de tamanho, bem como qualquer uma das outras etapas de purificação examinadas aqui. Qualquer tipo de calor pode ser aplicado à trombina, de qualquer fonte, por qualquer extensão de tempo, contanto que as impurezas virais sejam inativadas e a trombina ainda mantenha uma elevada atividade específica.

Em certas formas de realização a trombina pode ser aquecida a 40 °C a 100 °C. Em formas de realização preferidas, a trombina é aquecida a cerca de 60 °C. O tratamento térmico pode ser aplicado à trombina durante qualquer extensão de tempo. Por exemplo, a trombina pode ser aquecida por 1 a 60 minutos ou a trombina pode ser aquecida por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 horas. Em uma forma de realização preferida, um tratamento térmico é aplicado à trombina por 10 horas a 60 °C.

5.2.4 AJUSTE DO PH

Outra etapa de purificação que pode ser usada nos métodos da presente invenção é o ajuste do pH da trombina. O pH da trombina pode ser ajustado a qualquer nível, contanto que a composição de trombina resultante tenha baixas quantidades de impurezas virais. Por exemplo, a diminuição do pH da trombina é eficaz na inativação de impurezas virais. Em certas formas de realização, o pH da trombina é ajustado a abaixo de cerca de 5 ou abaixo de cerca de 4. Entretanto, o abaixamento do pH da trombina pode resultar em alguma perda da atividade da trombina.

5.2.5 IRRADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA

Ainda outra etapa de purificação que pode ser usada nos métodos da presente invenção é a aplicação de radiação gama ou eletromagnética, ou luz UV. A aplicação de radiação à trombina pode também ser usada sozinha ou em combinação com qualquer uma das outras etapas de purificação aqui descritas.

A invenção da presente invenção constatou que a radiação eletromagnética e gama são ferramentas de inativação de vírus poderosas e robustas. Relatadamente, a irradiação gama é eficaz contra uma larga variedade de vírus. Entretanto, menos do que 70% de recuperação podem ser obtidos no caso de trombina comercialmente disponível.

A aplicação da luz UV pode também ser usada sozinha ou em combinação com as outras etapas de purificação da presente invenção e é

também um procedimento de inativação de vírus eficaz. Entretanto, alguma perda da atividade da trombina é observada com este método também. Os inventores observaram que curtos períodos de exposição podem resultar em menos perda de atividade.

5 5.3 PREPARAÇÕES/FORMULAÇÕES DE TROMBINA PURIFICADA

A presente invenção é também dirigida a composições de trombina purificadas pelos métodos acima. A composição de trombina da presente invenção têm pureza aumentada, elevada atividade específica e baixos níveis de impurezas, incluindo baixos níveis de impurezas, tais como
10 fator Va, príons e partículas virais.

As composições de trombina da presente invenção têm uma elevada atividade específica; preferivelmente, a atividade específica das composições de trombina da presente invenção é maior do que 1800 u/mg de proteína. A presente invenção abrange composições de trombina tendo uma
15 atividade específica variando de cerca de 1800 u/mg e 3000 u/mg, mais preferivelmente entre cerca de 1800 u/mg e 2400 u/mg. Em outras formas de realização, a atividade específica é entre cerca de 2400 u/mg e 2500 u/mg, entre cerca de 2500 u/mg e 2600 u/mg ou entre cerca de 2600 u/mg e 2700 u/mg, entre cerca de 2700 e 2800 u/mg de proteína, entre cerca de 2800 e
20 2900 u/mg de proteína ou entre cerca de 2900 e 3000 u/mg de proteína. Em certas formas de realização, a trombina tem uma atividade específica maior do que 3000 u/mg.

As composições de trombina da presente invenção são também substancialmente livres de impurezas de elevado peso molecular, incluindo
25 fator Va, agentes bacterianos, príons e agentes virais. Como aqui usado, uma composição que é “substancialmente livre” de impurezas de elevado peso molecular significa que as composições contêm menos do que cerca de 5-20% em peso, preferivelmente menos do que cerca de 15% em peso, mais preferivelmente menos do que cerca de 10% em peso. Como aqui usado, as

composições que são “substancialmente puras” contêm menos do que 5% das impurezas de elevado peso molecular em peso e, muitíssimo preferivelmente, menos do que cerca de 3% em peso das impurezas de elevado peso molecular.

Em uma forma de realização preferida, as composições de trombina da presente invenção são substancialmente livres de impurezas, tendo um peso molecular maior do que 40 kDa. Em outra forma de realização preferida, a trombina é substancialmente livres de impurezas tendo um peso molecular na faixa de 40 kDa a 300 kDa. Exemplos de impurezas de elevado peso molecular incluem fator Va (cadeia pesada (peso molecular = 105 kDa) e cadeia leve (peso molecular = 71 kDa/74 kDa)) e albumina de soro bovino (BSA; peso molecular = 66 kDa).

Em outra forma de realização, a invenção fornece composições de trombina substancialmente livres de impurezas de partículas virais. As impurezas de partículas virais são também exemplos de impurezas de elevado peso molecular. Os vírus que podem ser removidos pelos métodos da presente invenção incluem mas não são limitados a vírus da diarréia viral bovina (BVDV), vírus da pseudo raiva (PRV), vírus da encefalomiocardite (EMCV), parvovírus bovino (BPV), parvovírus canino (CPV), vírus stickleback (SBV), vírus da encefalite transmitida por carrapato (TBEV), rinovírus eqüino 1 (ERV-1), vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1), hepatite A (HAV), hepatite B (HBV) e hepatite C (HCV). Os vírus podem ser detectados por uma variedade de ensaios baseados em anticorpo, incluindo ELISAs e ensaios baseados em ácido nucléico, incluindo ensaios PCR e de hibridização.

Em uma forma de realização específica, a invenção fornece composições de trombina substancialmente livres do Fator Va. Em algumas formas de realização, o fator Va é reduzido em pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99%. Em certas formas de realização da invenção, após filtragem

de exclusão de tamanho, o fator Va pode raramente ser detectado na amostra concentrada (antes de ser diluído dentro de uma formulação final) e é tipicamente não detectado em absoluto na formulação final.

5 Em outras formas de realização, a quantidade de fator Va é reduzida a menos do que 0,4, menos do que 0,35, menos do que 0,3, menos do que 0,25, menos do que 0,2, menos do que 0,15, menos do que 0,1, menos do que 0,02 µg/1000 unidades de trombina ou qualquer outra quantidade atualmente indetectável.

10 Preferivelmente, a ausência de níveis reduzidos de fator Va é determinada por métodos de rotina conhecidos na arte, p. ex., métodos cromatográficos, incluindo eletroforese gel, ensaios de atividade de fator Va e ensaios baseados em anticorpo.

15 Em uma forma de realização preferida, as composições de trombina da presente invenção têm uma atividade específica maior do que 2800 u/mg de proteína e são substancialmente livres de impurezas de elevado peso molecular.

20 A trombina purificada pelos métodos da presente invenção podem ainda ser formuladas para uso clínico. As formulações de trombina da presente invenção preferivelmente são mais estáveis do que as formulações de trombina atualmente disponíveis. Adicionalmente, em certas formas de realização, as formulações de trombina da presente invenção são líquidas.

25 Em certas formas de realização, as formulações estabilizadas da presente invenção compreendem: trombina, em que a trombina é substancialmente livre de impurezas; e pelo menos um excipiente farmacologicamente aceitável. Em uma tal forma de realização, a trombina é trombina bovina.

Em certas formas de realização, as formulações estabilizadas da presente invenção compreendem trombina, pelo menos um polímero, pelo menos um álcool, pelo menos um sal e uma quantidade apropriada de um

ácido e/ou base para ajustar o pH à faixa desejada.

Em uma forma de realização, as formulações estabilizadas da presente invenção compreendem trombina, glicerol, polietileno glicol, acetato de sódio e cloreto de sódio e ácido clorídrico ou hidróxido de sódio ou ambos, para ajustar o pH a entre 5-8.

Em uma forma de realização preferida, as formulações estabilizadas da presente invenção compreendem trombina, cerca de 30% de glicerol em volume, cerca de 10% de polietileno glicol em volume, concentração de 0,025-0,05 M de acetato de sódio e concentração de 0,15-0,3M de cloreto de sódio e ácido clorídrico e hidróxido de sódio ou ambos, para ajustar o pH a uma faixa de 6-7.

A trombina purificada da presente invenção pode ser armazenada a 0-10 °C por 48 horas antes da formulação e/ou processamento estéril. Em uma forma de realização preferida, a esterilização da formulação da invenção é conseguida utilizando-se um filtro estéril de 0,2 micro. A formulação da presente invenção pode ser armazenada a 25 °C por até 2 anos sem processamento estéril. A presente invenção é dirigida a formulações de trombina estabilizadas, que mantenham pelo menos 60% de sua potência inicial por um período de dois anos. Em formas de realização preferidas, as formulações mantêm pelo menos 60% de sua potência inicial por um período de dois anos. Em formas de realização preferidas, as formulações mantêm pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de sua potência inicial. A invenção é particularmente dirigida a formulações que mantenham pelo menos 80%, 85%, 90%, ou 95% de sua potência inicial após 3 meses, pelo menos 70%, 80%, 85%, 90% ou 95% de sua potência inicial após 6 meses, pelo menos 70%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de sua potência inicial após 9 meses, pelo menos 70%, 80%, 85%, 90%, ou 95%% de sua potência inicial após 12 meses, e pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, ou 95%% de sua potência inicial após 18 meses. A presente invenção é também dirigida a

formulações de trombina estabilizadas, que mantenham pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% da potência de acordo com a reivindicação de rótulo inicial por um período de dois anos. A invenção é dirigida a formulações que mantenham pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de sua potência de rótulo inicial após 3 meses, pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de sua potência de rótulo inicial após 6 meses, pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de sua potência de rótulo inicial após 9 meses, pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de sua potência de rótulo inicial após 12 meses, pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de sua potência de rótulo inicial após 18 meses.

5.3.1 EXCIPIENTES

Excipientes farmacologicamente aceitáveis adequados incluem qualquer excipiente que auxilie na estabilização das formulações de trombina da presente invenção. Os excipientes farmacologicamente aceitáveis que são adequados para a presente invenção podem funcionar como diluentes, tampões, estabilizantes, tensoativos, agentes quelantes, conservantes.

Excipientes farmacologicamente aceitáveis adequados incluem mas não são limitados a líquidos aquosos, tais como água, ácidos e bases; solventes orgânicos, tais como álcoois; polímeros; sais ou suas combinações.

Ácidos adequados incluem mas não são limitados a ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico e ácido fosfórico. O ácido preferivelmente é ácido clorídrico.

Bases adequadas incluem mas não são limitadas a hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e hidróxido de amônio. A base preferivelmente é hidróxido de sódio.

Os ácidos e bases incluídas nas formulações de trombina líquidas estabilizadas da presente invenção podem ser usadas para ajustar o pH das formulações de trombina líquidas estabilizadas. O pH das formulações

de trombina líquidas estabilizadas da presente invenção pode ser ajustado a qualquer pH que estabilize as formulações de trombina da presente invenção. Em certas formas de realização, o pH da formulação de trombina é entre 4 e 9. Preferivelmente, o pH das formulações de trombina da presente invenção é entre 5 e 8. Mais preferivelmente, o pH das formulações de trombina da presente invenção é entre 5,5 e 7,7. Em uma forma de realização preferida o pH das formulações de trombina da presente invenção é $6,7 \pm 0,1$.

Álcoois adequados incluem mas não são limitados a álcoois poliídricos, tais como glicerol etileno glicol, propileno glicol, butileno glicol, 1,6-hexileno glicol, neopentil glicol, dietileno glicol, trimetilolpropano e pentaeritritol. O álcool preferido é glicerol.

A quantidade de álcool nas formulações de trombina líquidas estabilizadas da presente invenção pode ser de 0 a 80% em volume. Em certas formas de realização, a quantidade de álcool, por exemplo, glicerol, é de 10-50% em volume. Em formas de realização preferidas, a quantidade de álcool, por exemplo, glicerol, é de 20-40% ou 25-35% ou 30% em volume.

Polímeros adequados incluem mas não são limitados a polietileno glicol, estireno-isobutileno-estireno, poliuretanos, silicones, poliésteres, poliolefinas, poliisobutileno, copolímeros de etileno-alfaolefina, polímeros e copolímeros acrílicos, polímeros de vinil haleto, polivinil éteres, polivinilideno haletos, poliacrilonitrila, polivinil cetonas, polivinil aromáticos, polivinil ésteres, copolímeros de vinil monômeros, copolímeros de vinil monômeros e olefinas, poliamidas, resinas alquídicas, policarbonatos, polioximetilenos, poliimididas, poliéteres, resinas epóxi, poliuretanos, triacetato de raio, acetato de celulose, butirato de celulose, butirato de acetato de celulose, celofane, nitrato de celulose, propionato de celulose, éteres de celulose, carboximetil celulose, colágenos, quitinas, ácido polilático, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido polilático-óxido de polietileno, borrachas de EPDM, fluorossilicones, polissacarídeos, fosfolipídeos ou uma

combinação dos mesmos. O polímero preferido é polietileno glicol. Um polímero muito preferido é polietileno glicol 200-400.

A quantidade de polímero das formulações de trombina líquidas estabilizadas da presente invenção pode ser de 0 a 50% em peso. Em certas formas de realização, a quantidade de polímero, por exemplo, polietileno glicol, é de 1-30% em volume. Em formas de realização preferidas, a quantidade de polímero, por exemplo, polietileno glicol, é de 1-20% ou 5-15% ou 10% em volume.

Sais adequados incluem mas não são limitados a cloreto e brometo de cálcio, potássio ou sódio e similares; acetato de cálcio, potássio, céσιο ou sódio; citrato de potássio, céσιο ou sódio; nitrato de potássio, céσιο ou sódio; e formiato de potássio, céσιο ou sódio. Sais preferidos são acetato de sódio e cloreto de sódio.

A concentração dos sais das formulações da presente invenção podem ser de 0 a 0,5 M. Em certas formas de realização, a concentração de sal é de 0,01 a 0,45M. Em outras formas de realização, a concentração de sal é menor do que 0,3 M. Em formas de realização preferidas, o sal é uma combinação de cloreto de sódio e acetato de sódio, em que a concentração de cloreto de sódio é de 0,15-0,3M e a concentração de acetato de sódio é de 0,025-0,05 M. Outra faixa preferida de cloreto de sódio é 0,28 a 0,32 M.

5.4 TESTE DE POTÊNCIA

A trombina pode ser testada quanto à potência ou atividade, podendo ser testada usando-se ensaios conhecidos na arte. Um tal método é baseado nas medições do tempo de coagulação. As medições do tempo de coagulação podem ser determinadas usando-se um regulador de coagulação ACL7000. Os tempos de coagulação medidos são convertidos em u/ml usando-se uma regressão de duplo log do tempo de coagulação de curva padrão vs. u/ml. O valor u/ml foi multiplicado pelo fator de diluição para obter-se a atual potência da amostra. Os resultados de ensaio podem ter

alguma variabilidade devido a uma combinação de fatores, incluindo técnicas de pipetagem, diferentes máquinas ACL e viscosidade da amostra testada.

5.5. KITS E ADMINISTRAÇÃO

5 A presente invenção também abrange kits compreendendo formulações de trombina estabilizadas da presente invenção. Os kits incluem um frasco que contém as formulações de trombina estabilizadas da presente invenção. Enquanto nos frascos a formulação de trombina estabilizada deve satisfazer as seguintes especificações de produto:

Especificação		Liberação		Vida em Prateleira (2 anos em temperatura ambiente)
Potência		NLT 1.400 μ /ml		NLT 900 μ /ml
Volume de carga				
	5.000 μ /frasco	NLT 5,0 ml		NLT 5,0 ml
	10.000 μ /frasco	NLT 10,0 ml		NLT 10,0 ml
	20.000 μ /frasco	NLT 20,0 ml		NLT 20,0 ml
pH		5,9-7,5		5,9-7,5
Esterilidade		Satisfaz as exigências da USP e teste de esterilidade 21 CFR 610.12		
Segurança animal geral		Satisfaz as exigências de 21 CFR 610.11 modificado		

10 Em certas formas de realização, os kits da presente invenção compreendem as formulações de trombina estabilizadas; um frasco capaz de conter as formulações de trombina; e uma agulha. Os kits podem também incluir pelo menos uma esponja.

15 Em outras formas de realização, os kits da presente invenção são kits de spray, em que os kits compreendem uma formulação de trombina estabilizada e um dispositivo que é capaz de pulverizar a formulação de trombina. Dispositivos de pulverização adequados incluem uma ponte de spray ou uma bomba de spray e um atuador. Adicionalmente, os kits de spray podem ainda compreender uma agulha.

20 Com relação aos kits de spray, a formulação de trombina estabilizada pode também ser contida em um frasco. Os frascos contendo a formulação de trombina líquida incluída nos kits de spray devem atender às seguintes especificações de produto:

Especificação		Liberação		Vida em Prateleira (2 anos em temperatura ambiente)
Potência		NLT 1.400 µ/ml		NLT 900 µ/ml
Volume de carga				
	5.000 µ/frasco	NLT 5,0 ml		NLT 5,0 ml
	10.000 µ/frasco	NLT 10,0 ml		NLT 10,0 ml
	20.000 µ/frasco	NLT 20,0 ml		NLT 20,0 ml
pH		5,9-7,5		5,9-7,5
Esterilidade		Satisfaz as exigências da USP e teste de esterilidade 21 CFR 610.12 após esterilização com óxido de etileno		
Segurança animal geral		Satisfaz as exigências de 21 CFR 610.11 modificado após esterilização com óxido de etileno		

A presente invenção também refere-se a métodos de produzir formulações de trombina estabilizadas. Em certas formas de realização, um método para produzir formulações de trombina estabilizadas compreende (a) aumentar a pureza da trombina; e (b) adicionar pelo menos um excipiente farmacologicamente aceitável à trombina purificada.

Os métodos de produzir as formulações estabilizadas da presente invenção podem ainda compreender ajustar o pH com um ácido ou uma base.

A Figura 3 é um fluxograma que descreve um método de produzir formulações de trombina estabilizadas da presente invenção. Após preparar uma composição de trombina tendo aumentadas pureza e atividade específica, 28-33% em volume de glicerol e 7-11% em volume de um polietileno glicol, tendo um peso molecular entre 200-600, são adicionados à trombina purificada. Cloreto de sódio e acetato de sódio são adicionados até a concentração de cloreto de sódio ser 0,08-0,31 M e a concentração molar de acetato de sódio ser 0,02-0,06 M. O pH é ajustado a 5,7 a 7,7. A formulação de trombina estabilizada é então esfriada a 0-10 °C.

A formulação de trombina estabilizada pode então ser esterilizada e armazenada em frascos rotulados.

Adicionalmente, a presente invenção é também dirigida a métodos de administrar as formulações de trombina estabilizadas.

Preferivelmente, as formulações de trombina estabilizadas da presente invenção são administradas topicamente.

Em certas formas de realização, o método compreende (a) puxar a formulação de trombina para dentro de uma seringa; (b) forçar a formulação de trombina através da seringa; e (c) inundar a superfície de um lume corporal com a formulação de trombina.

Em outras formas de realização, o método compreende pulverizar a formulação de trombina tópica sobre a superfície de um lume corporal.

Em ainda outras formas de realização, o método compreende (a) saturar uma esponja com a formulação de trombina; e (b) aplicar a esponja à superfície de um lume humano.

A descrição contida aqui e os seguintes exemplos são para fins de ilustração e não para fins de limitação. Mudanças e modificações podem ser feitas às formas de realização da descrição e ainda situarem-se dentro do escopo da invenção. Além disso, mudanças, modificações ou variações óbvias ocorrerão par aqueles hábeis na arte.

6. EXEMPLOS

EXEMPLO 1-PREPARAÇÃO DE TROMBINA PRÉ-PURIFICADA

20 Trombina Bovina pré-purificada ou de baixa pureza

Preparação da Tromboplastina: Pulmão Bovino fresco é moído em equipamento de moagem convencional. O Pulmão Bovino Moído pode ser usado imediatamente ou armazenado congelado em recipientes polirevestidos a <-15 °C. O pulmão moído é suspenso em cloreto de sódio diluído a cerca de 0-15 °C e extraído por cerca de 12-72 horas. A suspensão de pulmão é filtrada através de tecido grosseiro e/ou, alternativamente, por centrifugação e o extrato líquido é coletado.

Enquanto sob agitação, aproximadamente 100 ml de uma suspensão de aproximadamente 50% de gel de hidróxido de magnésio são

adicionados por litro de extrato de pulmão e completamente misturados. A suspensão é centrifugada ou, alternativamente, filtrada com auxiliares de filtro e o centrifugado ou filtrado coletado. O extrato de pulmão adsorvido é fracionado adicionando-se, sob agitação, a cerca de 0-15 °C, aproximadamente um litro de sulfato de amônio saturado frio por litro de extrato de pulmão e misturados por cerca de 15-480 minutos. A pasta insolúvel é colhida por centrifugação ou, alternativamente, por filtração com auxiliares de filtro.

A pasta é ressolubilizada em cerca de 0,25 a 1 litro de cloreto de sódio diluído por litro de extrato de pulmão de partida. O extrato de pulmão fracionado é reprecipitado pela adição sob agitação a cerca de 0-15 °C, aproximadamente um litro de sulfato de amônio saturado frio por litro de solução e misturados por cerca de 15-480 minutos. A pasta insolúvel é colhida por centrifugação ou, alternativamente, por filtração com auxiliares de filtro. A segunda pasta é ressolubilizada em cloreto de sódio diluído frio e clarificada por filtração.

A solução de trombina é concentrada em um sistema de ultrafiltro adequado a cerca de 10-50% do volume original e então diafiltrado para remover sulfato de amônio detectável. A ultrafiltração é um processo pelo qual uma solução com um soluto de tamanho molecular, que é muito maior do que aquele do solvente, é separado do solvente pela aplicação de pressão hidráulica. A pressão hidráulica força o solvente através de uma membrana adequada e concentra o soluto.

A diafiltração é conduzida adicionando-se 8 ou mais volumes de NaCl 0,05 M ou até o permeado passado pelo teste de cloreto de bário. A diafiltração é um processo de separar microssolutos de uma solução de moléculas maiores por ultrafiltração com uma adição contínua de solvente. O concentrado é então ainda opcionalmente concentrado e a ultrafiltração completada. O sistema de ultrafiltração é enxaguado com diversos litros de

cloreto de sódio diluído esfriado e esta lavagem é adicionada ao concentrado. O pH do concentrado é ajustado a cerca de 7,0 com ácido clorídrico diluído ou hidróxido de sódio diluído. A tromboplastina resultante é armazenada a cerca de -15°C ou mais frio em recipientes plásticos selados.

5 Plasma Bovino Fresco, citratado, é recebido congelado ou esfriado em um caminhão tanque. Se recebido congelado, o plasma é geralmente armazenado congelado até descongelado para uso. O plasma descongelado é mantido a $0-10^{\circ}\text{C}$ em tanques de aço inoxidável. O pH do plasma é ajustado com ácido acético tamponado a cerca de 6,5-6,8 e mantido
10 por cerca de 3-30 horas. No final do tempo de retenção, o Plasma é clarificado. O plasma purificado é ajustado com solução de hidróxido de sódio a cerca de pH 6,9-7,2.

Preparação de Protrombina: sob agitação e em uma temperatura de cerca de $0-10^{\circ}\text{C}$, cerca de 1,5-2,5 (peso seco) gramas de
15 resina de troca de íons são adicionados por litro de Plasma Bovino e misturados 0,5-6 horas, enquanto controlando o pH a cerca de 6,9-7,2. A suspensão resultante é filtrada ou centrifugada para colher a resina. A resina é lavada completamente com solução salina tamponada com fosfato 0,15-0,2 molar a pH de cerca de 6,9-7,2 e guardada.

20 A Protrombina é eluída da resina lavada usando-se solução salina tamponada com fosfato 0,5-1 molar em um pH de aproximadamente 6,9-7,2, filtrada e os extratos separados e reunidos para mais processamento. As resinas que podem ser usadas incluem mas não são limitadas a DEAE-Sephadex A-50, Marco-Prep DEAE Support, Macro-Prep High Q Support,
25 Macro-Prep Q Support, UNOsphere Q ion exchange, Capto Q, DEAE-Sepharose Fast Flow, Q SepharoseTM HP ou equivalente. Os extratos combinados podem ser filtrados grosseiramente se desejado antes da ultrafiltração. A resina gasta pode ser tratada com ácido e armazenada antes da subsequente regeneração e reutilização em um processo de manufatura

de complexo de protrombina similar.

O extrato de Complexo de Protrombina é concentrado em um sistema de ultrafiltro adequado a cerca de 10-50% do volume original e então diafiltrado para remover sais indesejados. A diafiltração é primeiro
5 conduzida adicionando-se aproximadamente dois a cinco litros de água purificada esfriada por litro de concentrado como permeado, removida e então, por adição de aproximadamente dois a cinco litros de cloreto de sódio diluído esfriado por litro de concentrado como permeado, é removida. O concentrado é então ainda opcionalmente concentrado e a ultrafiltração
10 completada. O sistema de ultrafiltração é enxaguado com diversos litros de cloreto de sódio diluído esfriado e esta lavagem é adicionada ao concentrado. O Complexo de Protrombina resultante é estocado a cerca de 15 °C ou mais frio em recipientes selados.

O Complexo de Protrombina é descongelado a cerca de 35 °C
15 ou menos. O Complexo de Protrombina é diluído a aproximadamente 1000-5000 u/ml por adição de água purificada contendo suficiente cloreto de cálcio para produzir a concentração de cloreto de cálcio final de cerca de 0,005-0,03 molar. A suspensão de tromboplastina é adicionada concomitantemente com o complexo de protrombina com o cloreto de cálcio, sob suave agitação. O pH é
20 ajustado a cerca de 7.3 e misturado por cerca de 15-60 minutos. Em seguida à ativação a cerca de 15-30 °C, a suspensão é esfriada a cerca de ≤ 10 °C.

Ativação e purificação da trombina: o Complexo de Protrombina ativado é diluído a aproximadamente 500-3000 u/ml com tampão de citrato de sódio diluído, pH de cerca de 6,6. O material pode ser
25 refiltrado como necessário.

O pH da mistura acima descrita é ajustado a cerca de 6,6 pela adição de ácido clorídrico diluído ou hidróxido de sódio diluído. O Complexo de Protrombina ativado é adicionado a uma resina de troca de cátions, que foi ajustada a um pH de cerca de 6,6. As resinas que podem ser usadas incluem

mas não são limitadas a Amberlite CG-50, Macro-Prep CM Support, Macro-Prep High S Support, Macro-Prep S Support, UNOsphere S ion exchange, SP SepharoseTM HP, resina Capto S ou equivalente.

5 A coluna é lavada com citrato de sódio diluído pH 6,6 e então lavada com cloreto de sódio de cerca de 0,1 a 0,25 molar, para remover proteínas de baixa afinidade, que são descartadas. Isto é seguido pela aplicação de cloreto de sódio aproximadamente 0,5-1 molar para eluir a trombina purificada. O eluato é coletado em frações que são combinadas de acordo com um ensaio em-processo. A massa não-estétil pode ser armazenada a cerca de 0-10 °C por até cerca de 48 horas enquanto em processo. A trombina de massa não-estétil é formulada a não menos do que cerca de 1000 u/ml por adição de água para irrigação, 30% glicerol, 10% PEG e cloreto de sódio de aproximadamente 0,15-0,3 M. O pH da solução de trombina formulada é ajustado a pH de cerca de $6,7 \pm 1,00$ com ácido clorídrico diluído ou hidróxido de sódio. A trombina de massa não-estétil formulada pode ser armazenada a cerca de 0-10 °C por até aproximadamente 48 horas antes do processamento estétil.

15 A trombina de massa não-estétil formulada é esterilizada por passagem através de filtros de liberação não-fibrosos retentores bacterianos estéreis para dentro de um tanque de retenção estétil adequado. O produto resultante é uma α -trombina altamente concentrada, que tem um MW de cerca de 40 kDa. As amostras têm uma atividade específica média de \geq a cerca de 1500 u/mg de proteína.

25 Além disso, estudos de depuração de príon foram realizados usando-se uma etapa de purificação cromatográfica de troca de íons. Os resultados indicam que o nível de depuração de príon, obtido pela etapa de purificação cromatográfica de trombina é igual a 3,5 log.

A coluna de pequena escala usada tinha um diâmetro interno de 1,6 cm e foi embalada a uma altura de 50,2 cm com resina. Assim, o

volume de leite da coluna foi igual a cerca de 101 ml. A coluna guarnecida foi equilibrada com 100 ml de NaCl 1M, seguido por 100 ml de Na-citrato 0,025M pH 6,61. A taxa de fluxo do sistema de cromatografia foi ajustada a 3,3 ml/min.

5 A amostra reforçada consistiu de 8 ml de homogeneizado de cérebro de hamster Scarpie cepa 263K. O homogeneizado foi sonicado por 20 minutos, então filtrado através de filtros de 0,45, 0,2 e 0,1 μm . Após o reforço de amostra, um total de 12 ml foi retirado para os testes de pré-cromatografia, deixando uma amostra reforçada de pré-coluna de 396 ml (400 + 8-12 ml).

10 A coluna pré-equilibrada foi carregada com os 396 ml de trombina bruta, lavada com 144 ml de tampão de Na-citrato 0,025M, até absorvência de eluente ficasse abaixo de 0,4AU, e lavada com 275 ml de NaCl 0,2M, até a absorvência de eluente ficasse abaixo de 0,2 AU. A coluna foi então extraída com NaCl 0,65 M e 37 ml de trombina purificada foram
15 coletados do tempo em que a absorvência alcançou 2AU até o tempo em que ela caiu para 2AU.

As amostras de pré e pós cromatografia coletadas foram armazenadas a -60°C ou abaixo antes de realizar o ensaio Western Blot de príon. Os resultados são mostrados na Tabela 1.

20

Tabela 1

Código Registro Amostra	Descrição amostra	Volume amostra (ml)	Título Final ($\log_{10}(\text{PrP}^{\text{RES}}/\text{ml})$)	\log_{10} final (PrP^{RES})	Valor Redução em log
1	Carga Reforçada	396	5,8	8,4	3,5
2	Pós coluna	37	3,3	4,9	

* $\log_{10}(\text{PrP}^{\text{RES}})$ total \approx Título Final ($\log_{10}(\text{PrP}^{\text{RES}} / \text{ml})$) + \log_{10} (volume amostra (ml))

EXEMPLO 2-DEPURAÇÃO VIRAL UTILIZANDO FILTRAGEM DE EXCLUSÃO DE TAMANHO

25

As membranas usadas neste exemplo são ÔmegaTM (100K VR e são “moldadas de polietersulfona modificada em um suporte de poliolefina

altamente porosa, que concede resistência e rigidez à membrana acabada”. O ponto de corte de peso molecular teórico é 100 kDa. A passagem de pequenas moléculas é possível somente sob condições de filtragem de fluxo tangencial. As grandes moléculas e vírus são retidos por exclusão de tamanho. O valor de redução em log (LRV) para Parvovírus bovino (BPV), que é um muito pequeno vírus (20 nm) não-envelopado, foi determinado exceder cerca de 3,5 log.

A solução de trombina avaliada durante este estudo de depuração viral é uma trombina pré-purificada. As amostras tipicamente têm uma atividade específica maior do que cerca de 1500 u/mg de proteína. A concentração de proteína é estimada a aproximadamente 1,2% e a concentração de sal a cerca de 0,65 M NaCl. O componente principal desta solução de trombina é o Ingrediente Farmacêutico Ativo α -trombina, que tem um peso molecular de aproximadamente 40 kDa.

Há diversas considerações quando escolhendo-se um painel de vírus modelo a ser incluído em um estudo de depuração viral. Uma é modelar vírus importante que têm um claro potencial de contaminar os materiais de partida. Outra é incluir vírus que têm uma larga faixa de características físicas e químicas, no painel de vírus modelo, de modo que, se o estudo de depuração de vírus apresentar boa depuração destes vírus, então tem-se certeza de que o procedimento de manufatura pode efetivamente limpar agentes virais inesperados.

É importante considerar o parvo vírus Bovino (BPV) porque ele é um vírus importante, que tem um claro potencial de contaminar os materiais de partida e também é extremamente pequeno, não-envelopado e muito resistente a tratamentos físico-químicos. O vírus da leucemia murina xenotrópica (XMuLV), vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e o vírus da pseudo-raiva (PRV) são também incluídos bem como BPV. Este painel de vírus fornece vírus modelo para os vírus importantes e fornece uma boa faixa de características físicas e químicas, de modo que a depuração destes vírus sugeriria que o procedimento de manufatura poderia limpar os agentes

inesperados. As características do painel de vírus são indicadas na Tabela 2.

Tabela 2 Resumo das características dos quadro vírus escolhidos

Vírus	Genoma	Envelope	Família	Tamanho (nm)	Resistência a agentes físico químicos
BPV	DNA	Não	Parvo	20-25	Alta
XmuLV	RNA	Sim	Retro	80-110	Baixa
PRV	DNA	Sim	Herpes	150-200	Média
BVDV	RNA	Sim	Flavi	40-70	Média

Para cada um dos quatro vírus considerados, duas filtrações são realizadas: uma em uma pressão de alimentação alvo de 8 psi ($0,56 \text{ kg/cm}^2$) e a outra em uma pressão de alimentação alvo de $0,84 \text{ kg/cm}^2$. Cada filtração é realizada empregando-se uma nova membrana ÔmegaTM 100 K VR.

Todas as filtrações são realizadas em um recinto frio. Cada filtração consiste em reforçar a amostra com 5% (v/v) de um dos quatro vírus, filtrar através de um filtro de $0,45 \mu\text{m}$ para remover quaisquer agregados de vírus, em seguida filtrar através da membrana Pall Ômega 100 K VR. O teste dos vírus é realizado em amostras retiradas pós reforço, pós filtração de $0,45 \mu\text{m}$ e pós filtração por membrana Ômega 100K VR.

A filtração da trombina consiste de filtrar cerca de 400 ml de trombina pré-purificada através de uma membrana de $0,1 \text{ pé}^2$ ($0,929 \text{ dm}^2$) Ômega 100K VR. Após 80% (320 ml) do volume de trombina inicial ser coletado no permeado, o retido de 80 ml restante ainda continha muita trombina, além dos vírus e impurezas de não-trombina. Diafiltração contínua desta solução de 80 ml é usada a fim de maximizar a transmitância da trombina. Isto é conseguido por diafiltração dos 80 ml com 6x aquele volume (480 ml) com uma solução de NaCl.

O volume de permeado final é assim duas vezes o volume da amostra de trombina inicial. A concentração deste permeado através de um cassete de membrana 10K VR é então realizada para trazer de volta o volume e concentração ao nível desejado. A pureza do produto final é muito aumentada, como resultado desta filtração. Por exemplo, a atividade específica é aumentada em mais do que 30% e o teor de fator Va é reduzido a

Para cada filtração, uma amostra de trombina reforçada de 420 ml é filtrada através de uma membrana de 0,1 pé² (9,29 dm²) ÔmegaTM 100K VR. Quando 340 ml de permeado são coletados, os restantes 80 ml de solução de retido são diafiltrados com 6 vezes aquele volume, empregando-se uma
 5 solução de NaCl 0,65 M. Portanto, o volume de permeado total é igual a 340 + (6 x 80) = 820 ml. Estas condições de filtração produzem recuperação aceitável de trombina, bem como aumentado grau de pureza de trombina.

A fluxo cruzado no início das filtrações de 8 psi (9,29 cm²) varia de 41-44 ml/ml. A filtração de fluxo cruzado é um método de operação
 10 em que o fluido retido é circulado através da superfície da membrana, o que evita acúmulo do material filtrado na membrana. O fluxo cruzado no início das filtrações de 12 psi (0,84 kg/cm²) varia de 54-56 ml/min. O tempo do processo para as filtrações de 8 psi (0,84 kg/cm²) varia de 236-257 min. O tempo do processo para as filtrações de 12 psi (0,84 kg/cm²) varia de 190-223
 15 min). Os resultados da depuração dos quatro diferentes vírus são resumidos na Tabela 4.

Tabela 4-Resumo dos resultados da depuração viral

Vírus	PRV		BVD		BPV		XmuLV	
	Título+95% CI (Log ₁₀ PFU/ml)		Título+95% CI (Log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)		Título+95% CI (Log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)		Título+95% CI (Log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	
Filtração	1	2	1	2	1	2	1	2
LRV por filtração	≥4,92	≥4,92	4,35	4,22	3,83	3,62	3,86	4,47
Média LRV por vírus	≥4,92		≥4,29		≥3,74		≥4,26	

Os elevados valores de depuração conseguidos e a similaridade dos resultados obtidos entre as filtrações em duplicata para todos
 20 os vírus indicam que a etapa de filtração é robusta. Os valores de redução em log médios foram acima de 4 para todos os vírus, exceto BPV, que tinha um valor de redução em log de 3,74 ± 0,39. Mesmo embora este valor de redução em log fosse ligeiramente abaixo de 4 log, é ainda muito elevado sob o conjunto de condições empregadas.

25 Além disso, estudos de depuração de príon foram realizados,

empregando-se a etapa de filtração de exclusão de tamanho. Os resultados indicam que o nível de depuração de príon obtido pela etapa de purificação de filtração de trombina é igual a 3,6 log.

5 O volume da amostra de trombina pré-reforço era igual a 400 ml.

A amostra de reforço consistiu de 8 ml de Homogeneizado de Cérebro de Hamster Scrapie Cepa 263 K. O homogeneizado foi sonificado por 20 minutos, em seguida filtrado através de filtros de 0,45, 0,2 e 0,1 μm .

10 Após reforço da amostra, 12 ml foram retirados para os testes de filtração pré-Ômega, deixando uma amostra reforçada pré-filtração de 396 ml (400 + 8-12 ml).

O filtro usado foi membrana Pall's Ômega™ 100K VR, com uma área de superfície de 0,1 pé² (9,29 dm²). Assim, a relação de volume de trombina para área de superfície de filtro foi de 4 l/pé².

15 A membrana Ômega™ 100K VR foi instalada no sistema de filtração e enxaguada com 500 ml de água purificada. O teste de integridade de pré-uso foi realizado e foi aprovado pelos critérios de aceitação. A membrana foi então condicionada com 100 ml de NaCl 0,65 M em uma pressão de alimentação de 10 psi (0,703 kg/cm²). As taxas de permeado e
20 fluxo cruzado, medidas em cilindros graduados, foram de cerca de 5 e 52 ml/min respectivamente.

A filtração dos 396 ml iniciais de amostra reforçada foi iniciada. Quando 325 ml do filtrado (isto é, cerca de 80% do volume inicial) foram coletados, a amostra restante foi diafiltrada com um total de 475 ml de
25 NaCl 0,65 M (isto é, cerca de 6 vezes o volume do retido). A pressão de alimentação foi mantida a cerca de 10 psi (0,703 kg/cm²) e a pressão do retido foi igual a 0 psi do princípio ao fim da realização de filtração. As condições de filtração mostraram previamente produzirem recuperação de trombina aceitável, bem como alta pureza de vírus.

O volume pós-filtragem final foi igual a 790 ml e o tempo do processo foi igual a 172 minutos.

As amostras de filtragem pré e pós Ômega coletadas foram armazenadas a -60°C ou abaixo antes da realização do ensaio Wester Blot. Os resultados são resumidos na Tabela 5.

Tabela 5

Código Registro Amostra	Descrição amostra	Volume amostra (ml)	Título Final ($\log_{10}(\text{PrP}^{\text{RES}}/\text{ml})$)	\log_{10} final (PrP^{RES})	Valor Redução em log
1	Carga Reforçada	396	5,7	8,3	3,6
2	Pós ômega	790	1,8	4,7	

* $\log_{10}(\text{PrP}^{\text{RES}})$ total = Título Final ($\log_{10}(\text{PrP}^{\text{RES}}/\text{ml})$) + \log_{10} (Volume amostra (ml))

EXEMPLO 3-DEPURAÇÃO VIRAL EMPREGANDO-SE FILTROS DE ÍON

Trombina purificada é primeiro concentrada usando-se um filtro Pall com 10 K MWCO e área de superfície de 1 pé² (9,29 dm²). Em seguida, as amostras concentradas são diluídas com água purificada à concentração de sal desejada. Um total de 15 bateladas é preparado. Os resultados de todas as bateladas preparadas são resumidos nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6-Recuperação percentual média para várias filtrações

Filtragem #	Descrição	% Recuperação	Redução em log para BPV
1,2 & 3	NaCl 50 mM, 0,8% de Manitol, pH ~5,5	74	$\geq 5,12 \pm 0,24$
11, 12 & 13	NaCl 50 mM, 0,8% de Manitol, pH ~7,0	76,9	NA
8, 9 & 10	NaCl 72 mM, 0,8% de Manitol, pH ~7,0	90,8	NA
14, 15 & 16	NaCl 72 mM, 0,8% sem Manitol, pH ~7,0	91,7	$3,60 \pm 0,62$
4,5 & 7	NaCl 108 mM, 0,8% de Manitol, pH ~7,0	99,8	$1,2 \pm 0,55$

Tabela 7-Resumo dos resultados

Filtragem#	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentração de NaCl (mM)	50	50	50	108	018	81	108	72
72	30192	21332	22111	32660	32660	32660	27217	24107
Volume inicial (ml)	600	500	500	400	400	400	400	290
Concentração em (ml)	213	175	151	250	350	350	310	150
Diluição com H ₂ O	1:13	1:13	1:13	1:6	1:6	1:8	1:6	1:9
Volume final de amostra formulada (ml)	2720	2245	1930	1500	2100	2800	1860	1350
Potência final de amostra formulada (ml)	4650	3753	4201	8562	6594	4135	5559	4719
% de recuperação	70	79	73	98,3	106	88,6	95	91,1
Manitol (% p/v)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
pH	5,49	5,51	5,53	7,04	7,05	7,02	7,03	7,10

Tabela 7 (cont.)

Filtragem#	9	10	11	12	13	14	15	16
Concentração de NaCl (mM)	72	72	50	50	50	72	72	72
72	23950	29161	22928	23826	24063	26569	22474	23977
Volume inicial (ml)	300	300	300	300	300	300	300	300
Concentração em (ml)	155	145	117	105	115	140	123	125
Diluição com H ₂ O	1:9	1:9	1:13	1:13	1:13	1:9	1:9	1:9
Volume final de amostra formulada (ml)	1395	1305	1521	1365	1495	1260	1107	1125
Potência final de amostra formulada (ml)	4768	5954	3288	4534	3454	5806	5781	5658
% de recuperação	92,6	88,8	72,7	86,5	71,5	91,8	94,9	88,5
Manitol (% p/v)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0	0	0
pH	7,05	7,05	7,05	7,07	7,02	6,98	6,95	7,03

As amostras das filtrações 1-3 (NaCl 50 mM) são inicialmente usadas para validação de depuração viral do filtro Mustang Q e resultam em valor de redução em log muito elevado para Parvo Vírus Bovino (BPV). Entretanto, uma vez que a recuperação da trombina é baixa, com a média de somente 74%, o estudo de depuração viral é repetido usando-se amostras das filtrações 4, 5 e 7 (NaCl 108 mM), que produz uma recuperação de trombina média de 99,8%, porém menos do que valores de redução de 2 log para BPV. Finalmente, o estudo de depuração viral é repetido usando-se amostras das filtrações 14, 14 e 16 (72 mM NaCl e 91,7% de recuperação) e o valor de redução em log para BPV foi aceitável ($3,6 \pm 0,62$).

Além disso, estudos de redução de príon foram realizados usando-se um filtro de troca de íon. Os resultados indicam que o nível de depuração de príon, obtido pela etapa de purificação de filtração de trombina,

é igual a mais do que 3,9 log.

O volume da amostra de trombina pré-reforço foi igual a 91 ml.

5 A amostra de reforço consistiu de 1,6 ml de Homogeneizado de Cérebro de Hamster Scrapie Cepa 236K. O homogeneizado foi sonicado por 20 minutos, em seguida filtrado através de filtros de 0,45, 0,2 e 0,1 μm .

12 ml foram retirados para os testes de filtragem pré-Mustang Q deixando uma amostra reforçada de pré-filtragem de 80,6 ml (91 + 1,6-12 ml).

10 O filtro usado foi Filtro Pall's Mustang Q, com uma área de superfície de 0,35 ml. Assim a relação de volume de trombina para área de superfície de filtro foi de 230 ml de amostra por ml de filtro.

15 O retentor de filtro foi sanitizado sem disco de filtro com 20 ml de NaOH 1N com uma retenção de 20 min. O filtro Mustang Q foi colocado no retentor, lavado com 20 ml de NaOH 1N, seguido com lavagem de NaCl 1M, até o pH do eluente ficar neutro.

Em seguida, o filtro foi condicionado com 25 ml de NaCl 72 mM em uma taxa de fluxo de cerca de 3 ml/min antes da filtragem real da amostra reforçada com 80,6 ml.

20 O volume de pós-filtragem final foi igual a 77 ml e o tempo do processo foi igual a 49 minutos.

As amostras de pré e pós filtragem de íon coletadas foram armazenadas a -60°C ou abaixo, antes de realizar o ensaio Western Blot. Os resultados são mostrados na Tabela 8.

25

Tabela 8

Código de registro de amostra	Descrição da amostra	Volume da amostra (mL)	Título final ($\log_{10}(\text{PrP}^{\text{RES}}/\text{ml})$)	Log_{10} total ($\text{PrP}^{\text{RES}})^*$	Valor de redução em log
1	Carga reforçada	80,6	4.8	6.7	>3.9
2	Saída	77	<0.9	<2.8	

EXEMPLO 4-FILTRAGEM DE EXCLUSÃO DE TAMANHO SOB VÁRIAS CONDIÇÕES

Este exemplo também utiliza filtragem de exclusão de tamanho empregando-se filtros Pall Ômega 100K VR. Três filtrações são realizadas em uma pressão de alimentação de 8 psi (0,56 kg/cm²) e três são realizadas em uma pressão de alimentação de 12 psi (0,84 kg/cm²). Os parâmetros do filtro diminuídos proporcionalmente são escolhidos para manter o volume para área de superfície de filtro constante e assegurar operação na faixa de pressão de alimentação especificada.

Cada filtragem é realizada com um novo filtro Pall Ômega 100K VR de 0,1 pé² (0,929 dm²) e todas as filtrações são realizadas em um ambiente frio (\leq cerca de 80°C). Um medidor de fluxo é incluído no sistema para melhorar a monitorar o fluxo cruzado durante a filtragem. O fluxômetro é calibrado no recinto frio antes do uso.

A Tabela 9 resume as condições e parâmetros das seis filtrações. Para as filtrações de 8 psi (0,56 kg/cm²), a atividade da trombina do material de partida medeia 22,091 u/ml e para o pool de filtrado final medeia 11,130 u/ml. A percentagem resultante de recuperação de trombina após 6 ciclos de realização de diafiltração medeia 86%. As filtrações realizadas em uma pressão de alimentação de 8 psi (0,56 kg/cm²) mostram ligeiramente mais recuperação de trombina do que a 12 psi (0,84 kg/cm²).

Tabela 9-Resumo de resultados de filtragem e recuperação de trombina

	Filtragem # 1	Filtragem# 2	Filtragem# 3	Filtragem # 4	Filtragem # 5	Filtragem # 6
Pressão de alimentação alvo	8	8	8	12	12	12
Volume de trombina (mL)	400	400	400	400	400	400
Volume de reforço (mL)	20	20	20	NA	NA	NA
Volume total amostra pré-filtragemTotal (mL)	420	420	420	400	400	400
Atividade da amostra pré-filtragem (mL)	22,696	24,177	19,399	21,559	21,559	20,747
Atividade total da amostra pré-filtragem (u)	9,532,320	10,154,340	8,147,580	8,623,600	8,623,600	8,298,800

Volume total da amostra pós-filtragem (mL)	820	820	820	800	800	800
Atividade da amostra pós-filtragem (u/mL)	10,405	13,210	9,776	8,631	9,940	8,923
Atividade total da amostra pós-filtragem (u)	8,532,100	10,832,200	8,016,320	6,904,800	7,952,000	7,138,400
% de Recuperação de trombina	89,5	106,7	98,4	80,0	92	86
Tempo de processo total	206	219	215	155	173,5	166

Uma diferença é que em uma pressão de alimentação de 12 psi (0,84 kg/cm²), o fluxo cruzado é mais elevado, resultando em uma passagem mais rápida de trombina, desse modo encurtando o tempo de processamento.

5 A Tabela 10 mostra que a etapa de filtragem resulta em um aumento de 36,4% em pureza da trombina ou atividade específica para as filtragem de 8 psi (0,56 kg/cm²) e um aumento de 37,1% para as filtragens de 12 psi (0,84 kg/cm²). A atividade específica aumenta de uma faixa de 1688,4 a 1986,0 de trombina/mg proteína nas amostras de pré-filtragem, a uma faixa de 2324,6 e 2690,1 de trombina/mg proteína nas amostras de pós-filtragem.

10 **Tabela 10. Atividade específica das amostras de filtragem pré vs. pós-ômega 100**

		Filtragem # 1	Filtragem # 2	Filtragem # 3	Média	Filtragem # 4	Filtragem # 5	Filtragem # 6	Média
Pressão da alimentação alvo (kg/cm ²)		0,56	0,56	0,56	0,56	0,84	0,84	0,84	0,84
Filtro Pré-Ômega 100	Atividade (μ/ml)	22.696	24.177	19.399		21.559	21.559	20.747	
	Proteína (mg/ml)	13,056	12,576	11,1406		10,8554	11,7673	12,2881	
	Atividade específica (μ/mg)	1738,4	1922,5	1741,3	1800,7	1986,0	1832,1	1688,4	1835,5
Filtro	Atividade (μ/ml)	10.405	13.210	9.776		8.631	9.940	8.923	
Pós-Ômega 100	Proteína (mg/ml)	4,236	5,108	4,2055		3,5337	3,695	3,7365	
	Atividade específica (μ/mg)	2456,3	2586,1	2324,6	2455,7	2.442,5	2.690,1	2.338,1	2490,0,562
0% de aumento em atividade específica devido à nanofiltragem		41,3	34,5	33,5	36,4	23,0	46,8	41,4	37,1

15 As frações de permeado são muito mais limpas do que a respectiva amostra de trombina de partida inicial, como mostrado na Figura 2. Quase todas as impurezas de elevado peso molecular, observadas no material de partida, são retidas pelo filtro no retido.

A Tabela 11 mostra que a etapa de filtração também resulta em uma substancial redução do teor de Fator Va. A redução média entre as filtrações realizadas nas duas pressões de alimentação é comparável: 88,5% em filtrações 8 psi (0,56 kg/cm²) e 89,3% nas filtrações de 12 psi (0,84 kg/cm²). O fator V/Va é associado com coagulopatias que podem ocorrer em pacientes em resposta a exposição cirúrgica a trombina bovina tóxica. O conhecimento atual sugere que a contaminação pelo fator V/Va da trombina bovina estimula a produção de anticorpos de Fator Va antbovinos de paciente, que pode reagir cruzadamente com o próprio fator Va do paciente, desse modo resultando em hemostase prejudicada. Esta etapa de filtração fornece os benefícios do benefício de substancialmente reduzir o teor do fator Va a níveis indetectáveis na Thrombin-JMI[®] final, conforme medido por ensaio imunoabsorvente ligado por enzima (ELISA) competitiva.

Tabela 11. Teor do fator VA de amostras de filtração pré- vs. pós-ômega 100 por elisa

		Filtração # 1	Filtração # 2	Filtração # 3	Média	Filtração # 4	Filtração # 5	Filtração # 6	Média
Pressão da alimentação alvo (psi)		0,56	0,56	0,56	0,56	0,84	0,84	0,84	0,84
Pré-Omega	(µg/ml)	44,993	45,566	40,879	43,813	22,954	22,954	37,163	27,690
	(µg/1000u)	1,982	1,885	2,107	1,991	1,065	1,065	1,791	1,307
Pós-ômega	(µg/ml)	3,625	2,017	1,801	2,481	0,741	0,708	2,357	1,269
	(µg/1000u)	0,348	0,153	0,184	0,228	0,086	0,071	0,264	0,140
0% de aumento em atividade específica devido à nanofiltração		82,4	91,9	91,3	88,5	91,9	93,3	85,3	89,3

EXEMPLO 5-FORMULAÇÃO DE TROMBINA ESTABILIZADA

A Tabela 12 mostra uma formulação de trombina purificada estabilizada, de acordo com a presente invenção.

Tabela 12-Formulações de trombina estabilizadas

Formulações de trombina estabilizadas	
Composição de trombina	NLT 1.400 unidades/ml
Glicerol	30% em volume
Polietileno glicol	10% em volume
Cloreto de sódio	Concentração 0,15-0,3M
Acetato de sódio	Concentração 0,025-0,05M
pH	6,7±0,1

A trombina para a formulação de trombina estabilizada foi criada de acordo com o processo da Figura 3. A composição de trombina de massa não-estéril foi formulada a não menos do que 1400 unidades/ml, pela adição de água para irrigação. Glicerol foi então adicionado a uma
5 concentração aproximada de 30% em volume. Polietileno glicol 200-400 MW foi adicionado a uma concentração aproximada de 10% em volume. Cloreto de sódio foi adicionado até a concentração do cloreto de sódio ser de aproximadamente 0,15-0,3M e acetato de sódio foi adicionado até a concentração do acetato de sódio ser de aproximadamente 0,025-0,05 M. O
10 pH da solução de trombina foi ajustada a um pH de $6,7 \pm 0,1$ com ácido clorídrico diluído ou hidróxido de sódio.

A formulação de trombina não esterilizada, estabilizada, foi então colocada em teste de estabilidade em temperatura ambiente ($23 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e as amostras foram testadas em vários pontos do tempo. As amostras
15 foram testadas em triplicata. O método de teste usado para ensaiar a potência ou atividade da trombina foi baseado em medições de tempo de coagulação. A máquina usada para determinar os tempos de coagulação foi o regulador de coagulação ACL 7000. As amostras foram diluídas a uma concentração que se situava dentro da faixa de curva padrão e colocada sobre o rotor da
20 máquina. Plasma humano foi também colocado no copo da máquina e amostras tanto de plasma como de trombina diluída foram incubadas a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, um volume especificado de cada um do plasma e trombina diluída foram concomitantemente bombeados e misturados. Após mistura, luz foi passada através da mistura de plasma/trombina e, quando um coagulo
25 formou-se a luz foi dispersa. Um detector mediu a luz dispersa e transformou o resultado em tempo de coagulação (segundos). O tempo de coagulação foi então convertido em u/ml, usando-se uma regressão em log dupla do tempo de coagulação da curva padrão vs. u/ml. Finalmente, o valor u/ml foi multiplicado pelo ator de diluição, para obter-se a potência real da amostra.

A Tabela 13 mostra os resultados da estabilidade durante 6 meses em temperatura ambiente ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) para a formulação da atual invenção.

Tabela 13-Formulações de trombina estabilizadas

Amostra	Reinv. do rótulo μ /frasco	Volume ml/frasco	Potência inicial μ /ml	3 mo. μ /ml	6 mo. μ /ml
1	5.000	5	1,661	1,613	1,611
2	20.000	20	1,661	1,727	1,672
3	5.000	5	1,486	1,451	1,327
4	20.000	20	1,486	1,483	1,492

5 A Tabela 14 mostra uma formulação de trombina, formulada para estabilidade melhorada, que não foi submetida aos métodos de purificação da atual invenção.

Tabela 14-Formulações de trombina estabilizadas

Formulações estabilizadas de trombina	
Composição de trombina	NLT 1.400 unidades/ml
Glicerol	30% em volume
Polietileno glicol	10% em volume
Cloreto de sódio	Concentração 0.15-0.3M
Acetato de sódio	Concentração 0.025-0.05M
pH	$6,7 \pm 0,1$

10 A composição de trombina de massa não-estéril foi formulada a não menos do que 1400 unidades/ml pela adição de água para irrigação. Glicerol foi então adicionado a uma concentração aproximada de 30% em volume. Polietileno glicol 200-400 MW foi adicionado a uma concentração aproximada de 10% em volume. Cloreto de sódio foi adicionado até a concentração do cloreto de sódio ser de aproximadamente 0,15-0,3M e
15 acetato de sódio foi adicionado, até a concentração do acetato de sódio ser aproximadamente de 0,025-0,05M. O pH da solução de trombina foi ajustado a um pH de $6,7 \pm 0,1$ com ácido clorídrico diluído ou hidróxido de sódio. A formulação foi então colocada em teste de estabilidade a ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e testada quanto a potência em intervalos de tempo regulares. As amostras

foram testadas em triplicata.

A Tabela 15 mostra os resultados da estabilidade durante 24 meses em temperatura ambiente ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tabela 15-Formulações de trombina estabilizadas

Amostra	Reiv. Rótulo	Volume	Potência inicial	3 mo.	6 mo.	9 mo.	12 mo.	24 mo.	24 mo. como
	u/frasco	mL/frasco	u/mL	u/mL	u/mL	u/mL	u/mL	u/mL	% de potência inicial
1	5.000	5	1.397	1.506	1.425	1.306	1.267	1.078	77,2
2		10	1.484	1.592	1.357	1.346	1.288	1.068	72,0
3	20.000	20	1.355	1.510	1.379	1.309	1.280	1.178	86,9
4	5.000	5	1.900	NA	1.717	1.644	1.768	1.502	79,1
5	5.000	5	1.765	NA	1.433	1.471	1.564	1.258	71,3
6	5.000	5	1.664	1.711	1.610	1.544	1.613	1.289	77,5
7	5.000	5	1.860	1.939	1.700	1.734	1.522	1.406	75,6
8	5.000	5	1.451	1.480	1.347	1.348	1.229	1.106	76,2

5 NA-não disponível

Embora exemplos específicos tenham sido dados, estes são formas de realização preferidas somente e pretendem explicar e descrever mais a invenção. Eles não destinados a definir o completo escopo desta invenção.

10 Todas as referências citadas aqui são incorporadas aqui por referência em sua totalidade e para todas as finalidades na mesma extensão como se cada publicação, patente ou pedido de patente individual fosse específica e individualmente para ser incorporado por referência em sua totalidade para todas as finalidades.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparar uma trombina purificada, caracterizado pelo fato de compreender:

5 (a) aplicar uma preparação de trombina a um filtro de exclusão de tamanho capaz de excluir impurezas que tenham um peso molecular maior do que 40 kDa; e

(b) recuperar a trombina purificada.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a fonte de trombina ser bovina.

10 3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a fonte de trombina ser Thrombin-JMI[®].

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o filtro de exclusão de tamanho ser capaz de excluir impurezas que tenham pesos moleculares variando de 40 kDa e 300 kDa.

15 5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o filtro de exclusão de tamanho ser selecionado de um capaz de excluir impurezas tendo peso molecular de 50 kDa, 100 kDa ou 150 kDa.

20 6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o filtro de exclusão de tamanho ser selecionado de um capaz de excluir impurezas tendo peso molecular de 50 kDa.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o filtro de exclusão de tamanho ser selecionado de um capaz de excluir impurezas tendo peso molecular de 100 kDa.

25 8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de as impurezas da trombina purificada recuperada serem reduzidas em pelo menos 50%.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de as impurezas na trombina purificada recuperada serem reduzidas em pelo menos 80%.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a atividade específica da trombina purificada recuperada ser aumentada em pelo menos 1000%.

5 11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a atividade específica da trombina purificada recuperada ser aumentada em pelo menos 1200%.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a atividade específica da trombina purificada recuperada ser aumentada em pelo menos 1500%.

10 13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a trombina purificada recuperada ser substancialmente livre de impurezas.

15 14. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a trombina purificada recuperada ser substancialmente livre de fator Va.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a trombina purificada recuperada ser substancialmente livre de príons.

20 16. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a trombina purificada recuperada ter uma redução de príon igual a pelo menos 3,5 log.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a trombina purificada recuperada ser substancialmente livre de agentes virais.

25 18. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a trombina purificada recuperada ser substancialmente pura.

19. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender ainda aplicar a trombina purificada recuperada a um filtro de troca de íons.

20. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender ainda aplicar a trombina purificada recuperada a uma etapa de purificação cromatográfica.

5 21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de a etapa de purificação cromatográfica compreender uma coluna de cromatografia por troca de íons.

22. Composição de trombina, caracterizada pelo fato de ser substancialmente livre de impurezas e ter um peso molecular maior do que 40 kDa.

10 23. Composição de trombina de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de ser substancialmente livre de impurezas tendo um peso molecular entre 50 kDa e 300 kDa.

24. Composição de trombina, caracterizada pelo fato de ser substancialmente livre de impurezas.

15 25. Composição de trombina, caracterizada pelo fato de ser substancialmente pura.

26. Composição de trombina, caracterizada pelo fato de ser substancialmente livre de fator Va.

20 27. Composição de trombina de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de o fator Va ser medido pelo ensaio de atividade do fator Va, ELISA, ou Western Blot.

28. Composição de trombina de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de o fator Va ser menor do que 0,5 µg/1000 unidades de trombina.

25 29. Composição de trombina, caracterizada pelo fato de ser substancialmente livre de agentes virais e seu valor de redução em log ser maior do que 3,5 por vírus.

30. Composição de trombina, caracterizada pelo fato de ter uma atividade específica entre cerca de 1800 e 3000 u/mg de proteína.

31. Composição de trombina de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de a atividade específica ser entre cerca de 1800 e 2400 u/mg de proteína.

5 32. Composição de trombina de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de a atividade específica ser entre cerca de 2400 e 2500 u/mg de proteína.

33. Composição de trombina de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de a atividade específica ser entre cerca de 2500 e 2600 u/mg de proteína.

10 34. Composição de trombina de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de a atividade específica ser entre cerca de 2600 e 2700 u/mg de proteína.

35. Composição de trombina de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de compreender ainda um excipiente.

15 36. Composição de trombina de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de compreender ainda um excipiente.

37. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender ainda aplicar a preparação de trombina a um filtro de troca de íons.

20 38. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender ainda aplicar um tratamento térmico à preparação de trombina.

25 39. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de o tratamento térmico incluir manter a trombina a 60°C por 10 horas.

40. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender abaixar o pH abaixo de cerca de 5 da preparação de trombina.

41. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado

pelo fato de compreender ainda aplicar radiação eletromagnética à preparação de trombina.

42. Método de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de a radiação eletromagnética ser radiação gama.

5 43. Método de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de a radiação eletromagnética ser radiação UV.

44. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a quantidade de preparação de trombina aplicada ao filtro de exclusão de tamanho ser de pelo menos 15 L.

10 45. Método de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de a preparação de trombina compreender pelo menos 300.000.000 unidades de trombina.

46. Método para preparar uma trombina tendo aumentada pureza, caracterizado pelo fato de compreender:

15 (a) aplicar a preparação de trombina a uma etapa de purificação cromatográfica;

(b) aplicar a preparação de trombina a um filtro de exclusão de tamanho;

20 (c) aplicar a preparação de trombina a um filtro de troca de íons; e

(d) recuperar a trombina purificada.

25 47. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de a etapa de purificação cromatográfica compreender uma coluna de cromatografia por troca de íons ou uma coluna de cromatografia por exclusão de tamanho.

48. Formulação de acordo com a reivindicação 36, caracterizada pelo fato de ser líquida.

49. Formulação de acordo com a reivindicação 36, caracterizada pelo fato de o excipiente farmacologicamente aceitável ser água,

glicerol, polietileno glicol ou um combinação dos mesmos.

50. Formulação de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de o glicerol ser entre 20-40% em volume.

51. Formulação de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de o polietileno glicol ser entre 1-20% em volume.

52. Formulação de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de o excipiente ser cloreto de sódio, acetato de sódio, citrato de sódio ou combinação dos mesmos.

53. Formulação de acordo com a reivindicação 49, caracterizada pelo fato de compreender ainda um ácido ou uma base.

54. Formulação de acordo com a reivindicação 53, caracterizada pelo fato de o ácido ou base ser ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

55. Formulação de acordo com a reivindicação 53, caracterizada pelo fato de as formulações terem um pH entre 5-9.

56. Formulação de acordo com a reivindicação 53, caracterizada pelo fato de as formulações terem um pH entre 6-8.

57. Formulação de trombina líquida estabilizada, caracterizada pelo fato de compreender uma composição de trombina que é substancialmente livre de impurezas e pelo menos um excipiente.

58. Formulação de trombina líquida estabilizada de acordo com a reivindicação 57, caracterizada pelo fato de na formulação manter pelo menos 60% de sua potência inicial por até dois anos.

59. Formulação de trombina líquida estabilizada de acordo com a reivindicação 57, caracterizada pelo fato de na formulação manter pelo menos 70% de sua potência de reivindicação de rótulo por até dois anos.

60. Formulação de trombina líquida estabilizada, caracterizada pelo fato de compreender:

uma composição de trombina em que a composição de

trombina é substancialmente livre de impurezas;

glicerol;

polietileno glicol;

cloreto de sódio;

5 acetato de sódio; e

em que a formulação tem um pH entre 6-8.

61. Método para administrar a formulação de trombina estabilizada como definida na reivindicação 57, caracterizado pelo fato de compreender administrar a formulação de trombina estabilizada topicamente.

10 62. Método para administrar a formulação de trombina estabilizada como definida na reivindicação 57, caracterizado pelo fato de compreender:

puxar a formulação de trombina para dentro de uma seringa;

forçar a formulação de trombina através da seringa; e

15 inundar a superfície de um lume de corpo com a formulação de trombina.

63. Método para administrar a formulação de trombina estabilizada como definida na reivindicação 57, caracterizado pelo fato de compreender pulverizar a formulação de trombina sobre a superfície de um
20 lume corporal.

64. Método para administrar a formulação de trombina estabilizada como definida na reivindicação 57, caracterizado pelo fato de compreender:

saturar uma esponja com a formulação de trombina; e

25 aplicar a esponja à superfície de um lume corporal.

65. Kit, caracterizado pelo fato de compreender:

a formulação de trombina estabilizada como definido na reivindicação 57;

um frasco capaz de conter a formulação de trombina; e

uma agulha.

66. Kit, caracterizado pelo fato de compreender:

a formulação de trombina estabilizada como definida na reivindicação 57; e

5 um dispositivo que é capaz de pulverizar a formulação de trombina.

67. Kit de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de o dispositivo ser uma ponta de spray ou uma bomba de spray.

10 68. Formulação de trombina líquida estabilizada, caracterizada pelo fato de compreender:

trombina;

glicerol;

polietileno glicol;

cloreto de sódio;

15 acetato de sódio; e

em que a formulação tem um pH entre 6-8

69. Formulação de trombina líquida estabilizada de acordo com a reivindicação 69, caracterizada pelo fato de na formulação manter pelo menos 60% de sua potência inicial por até dois anos.

20 70. Formulação de trombina líquida estabilizada de acordo com a reivindicação 69, caracterizada pelo fato de na formulação manter pelo menos 70% de sua potência rótulo inicial por até dois anos.

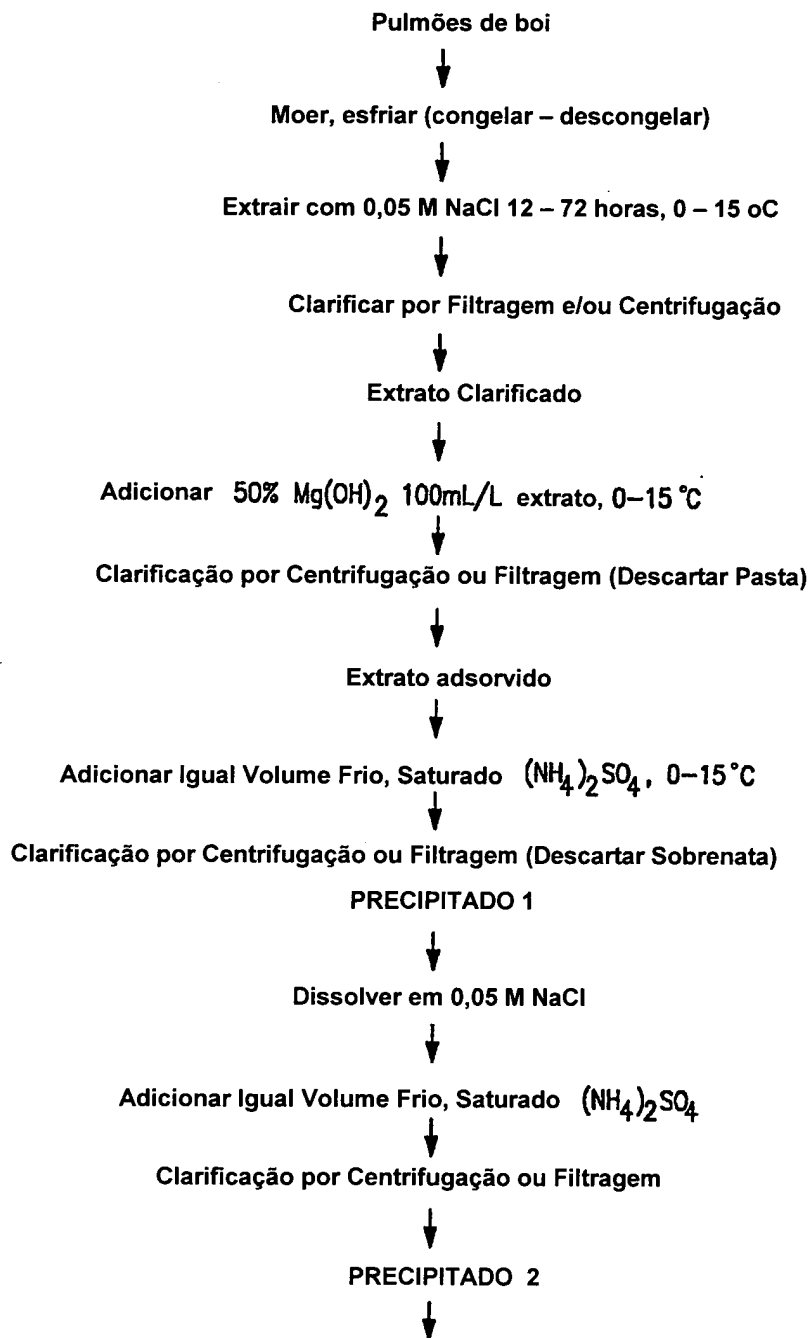


FIG. 1

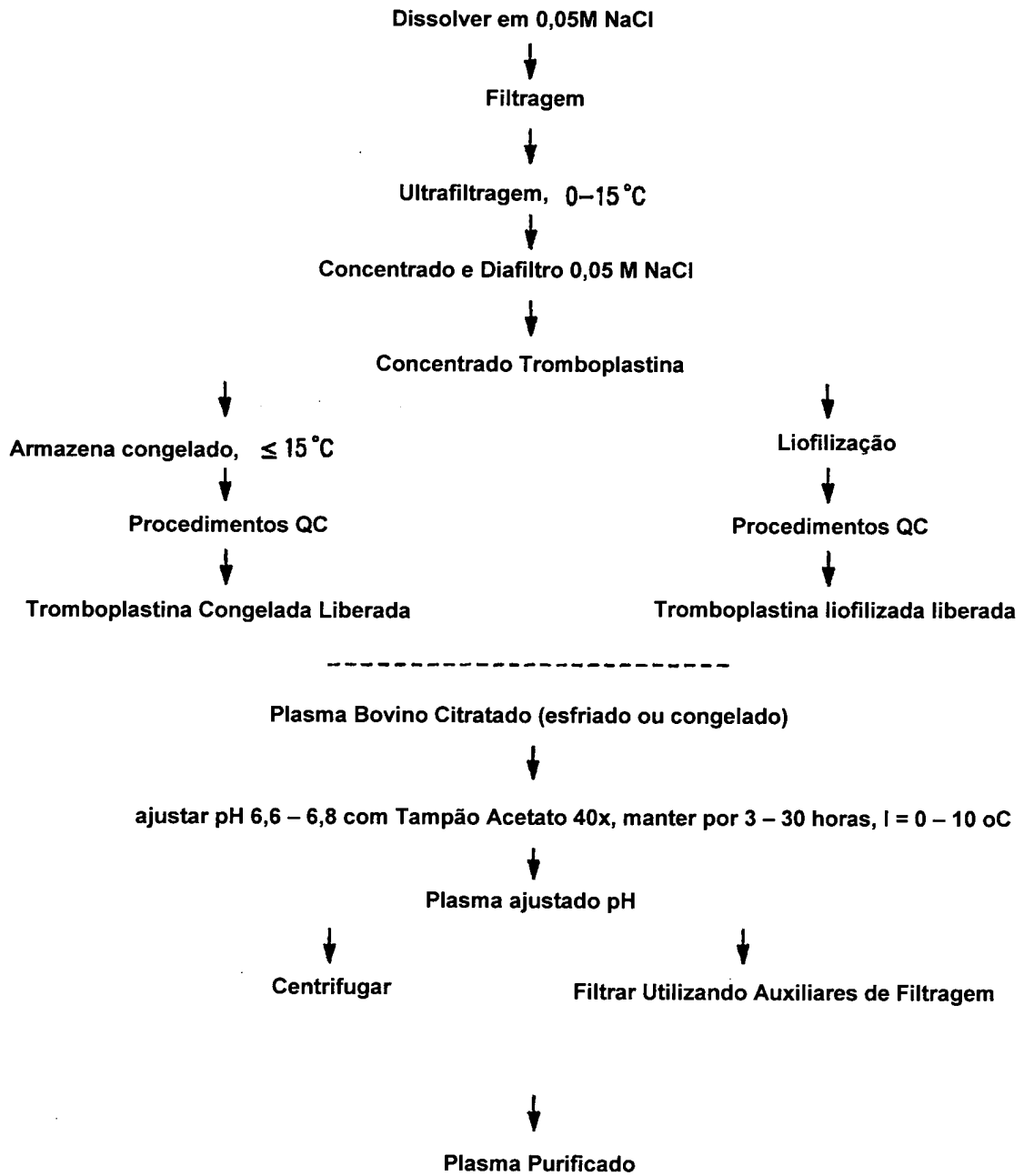
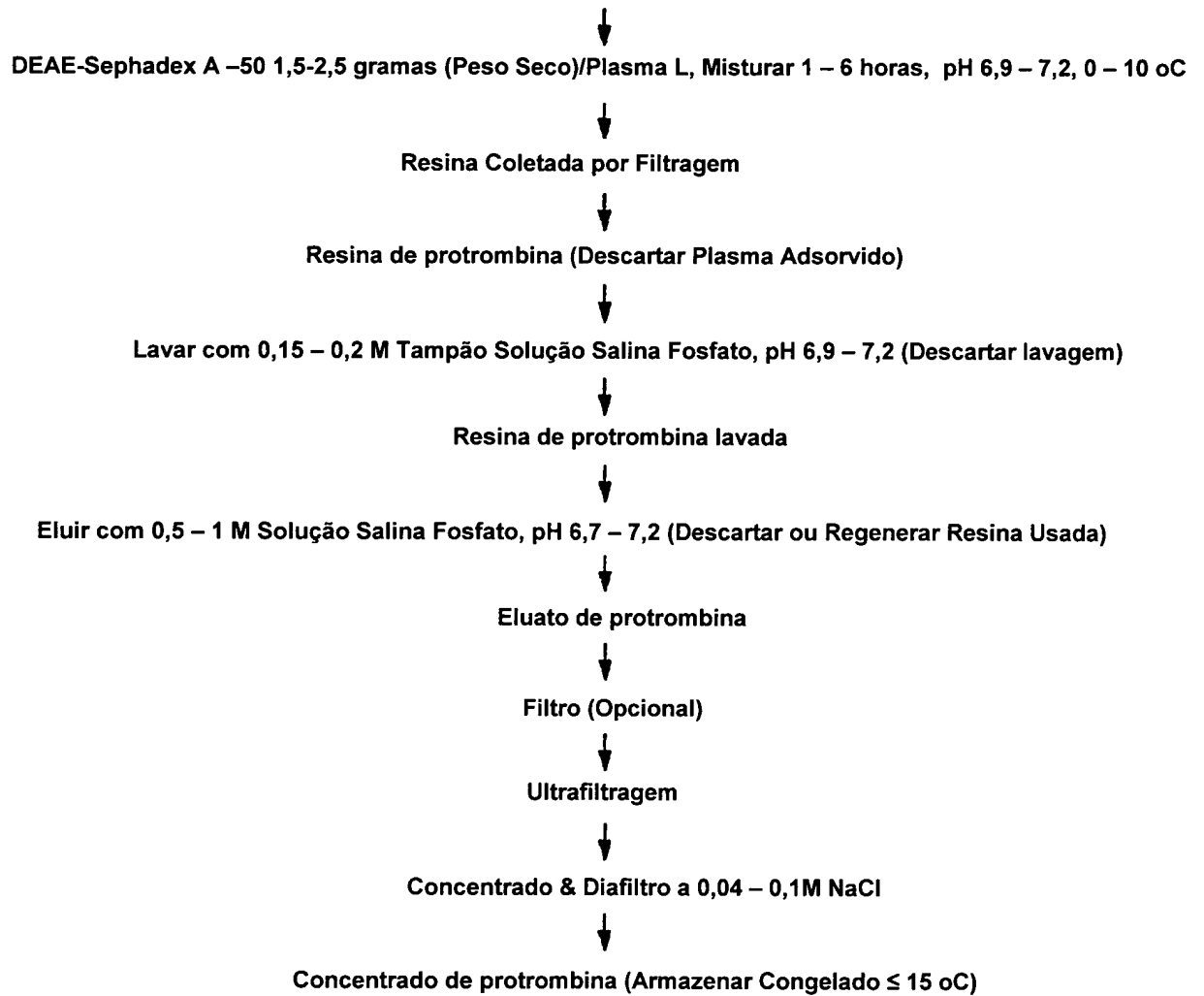
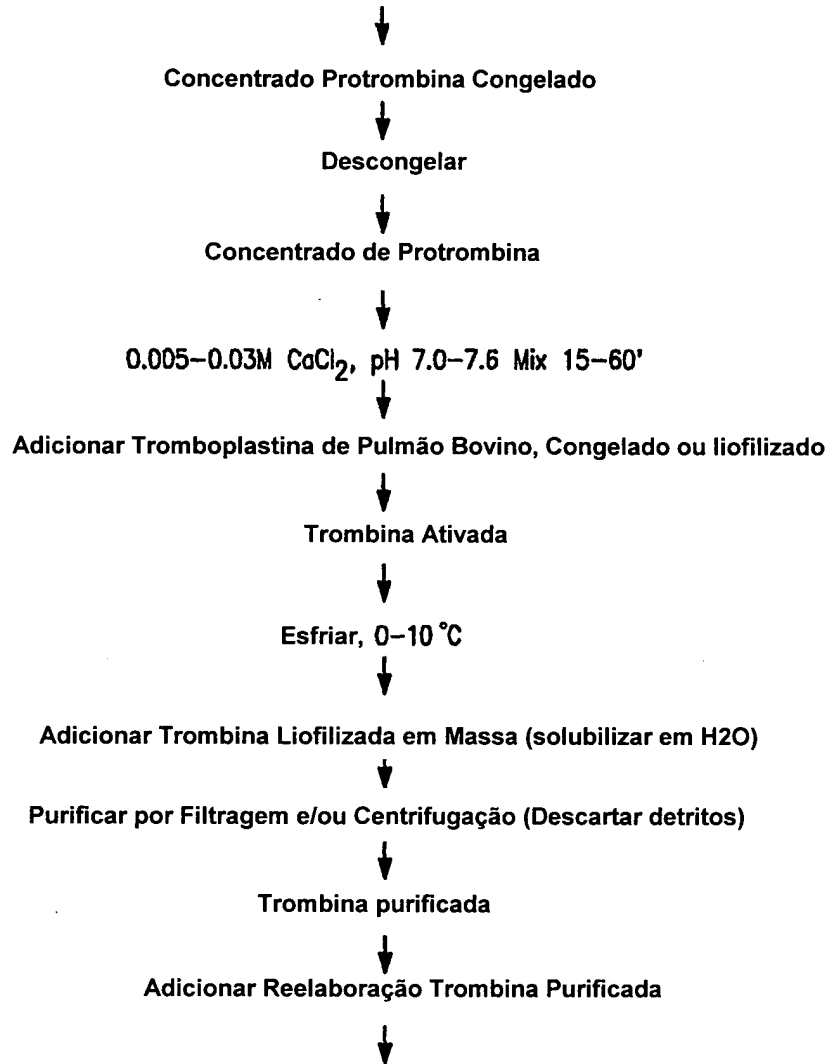


FIG. 1 (con't)

**FIG. 1 (con't)**

**FIG. 1 (con't)**

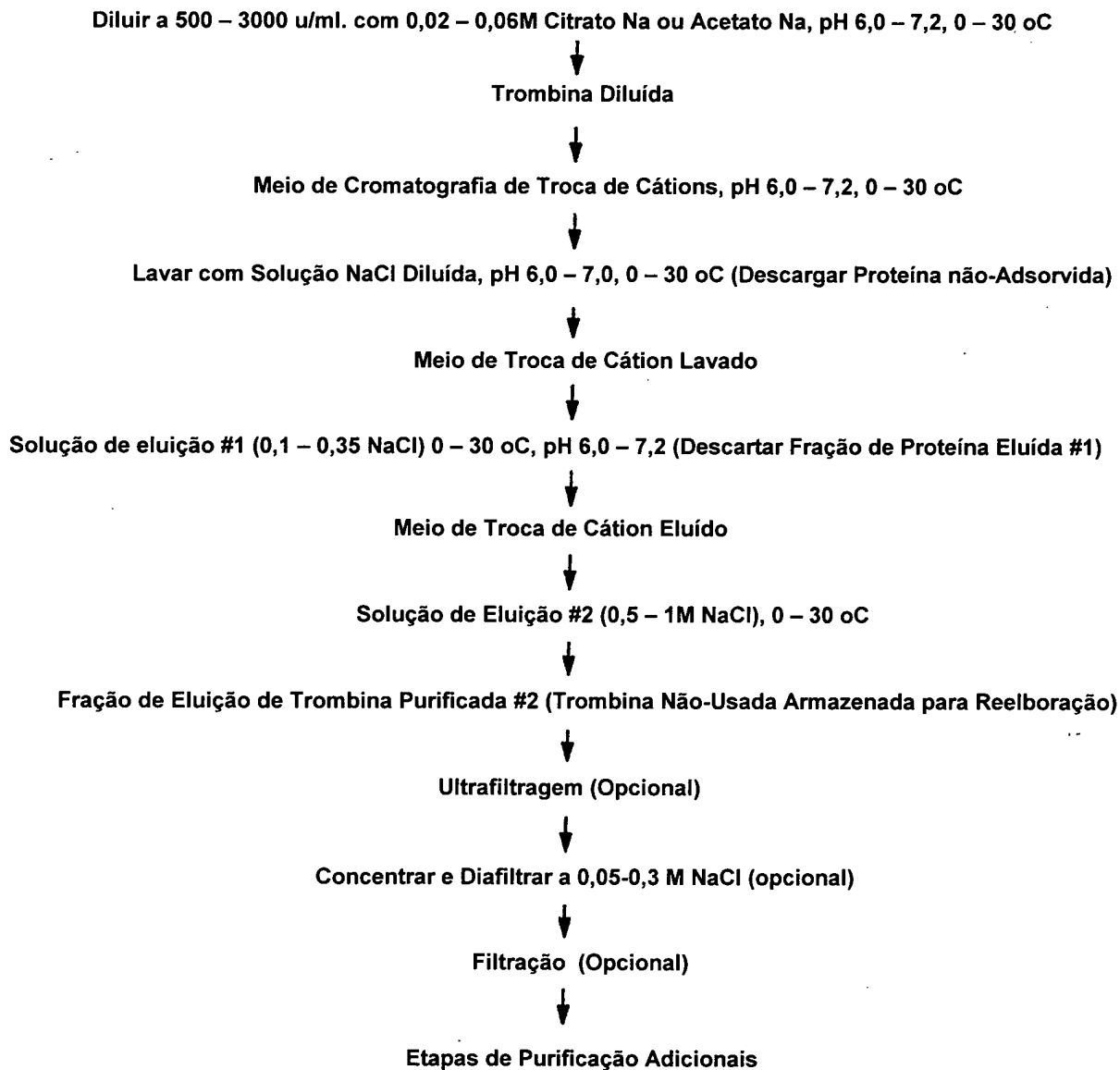
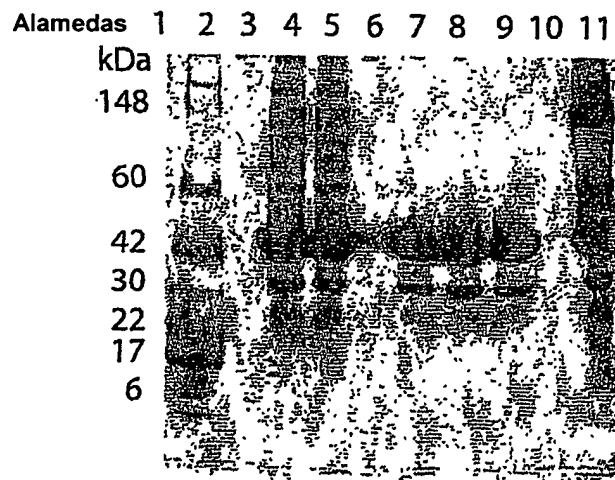
**FIG. 1 (con't)**

FIG. 2**Gel SDS-PAGE**

Alameda 2: padrão de peso molecular; Alamedas 4 – 5: Thrombin-JMI como manufaturada sem o processo de purificação da atual invenção; Alamedas 7 – 9: Trombina-JMI após a purificação da presente invenção; Alameda 11: retentivo da filtragem de exclusão de tamanho mostrando impurezas de elevado peso molecular.

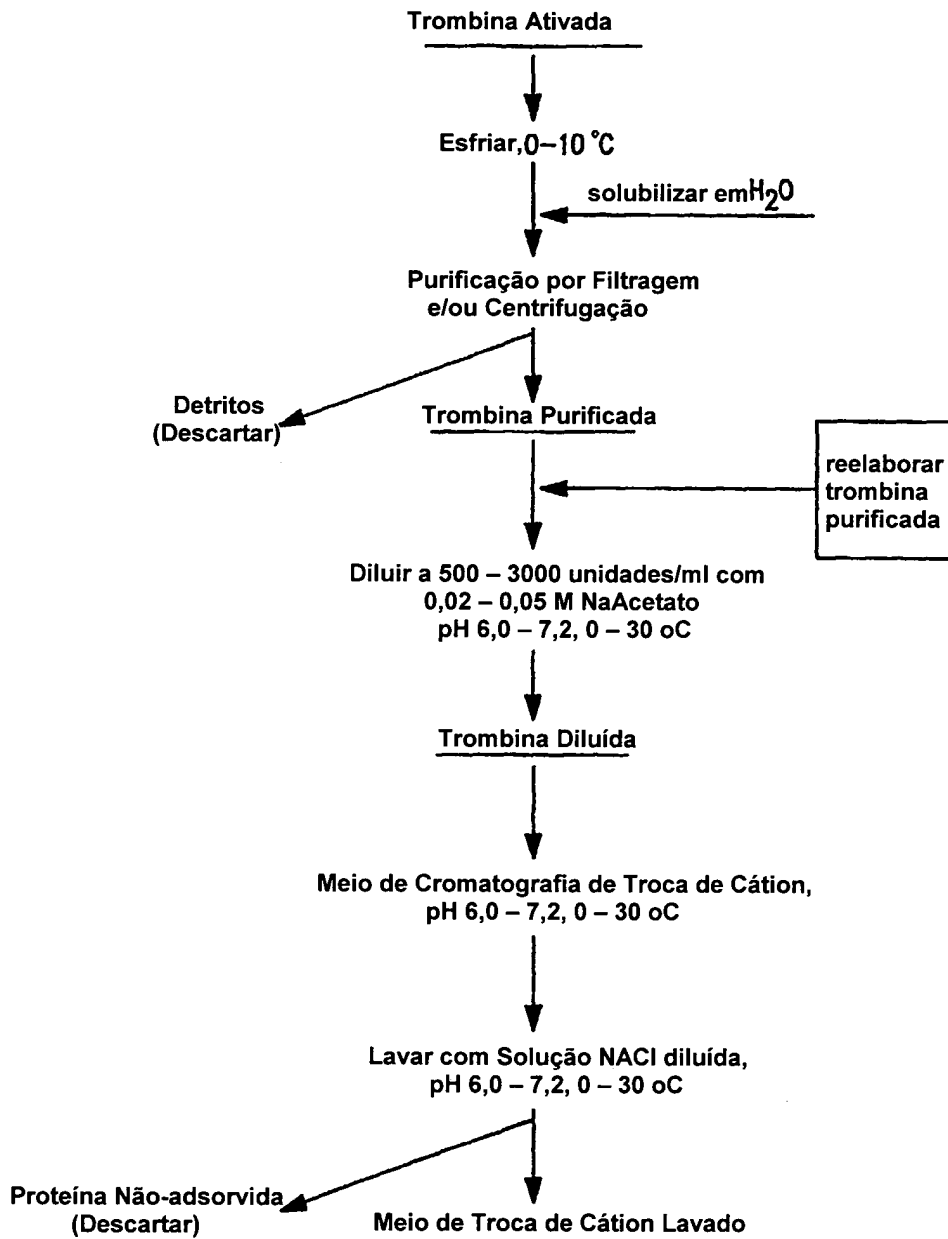


FIG. 3

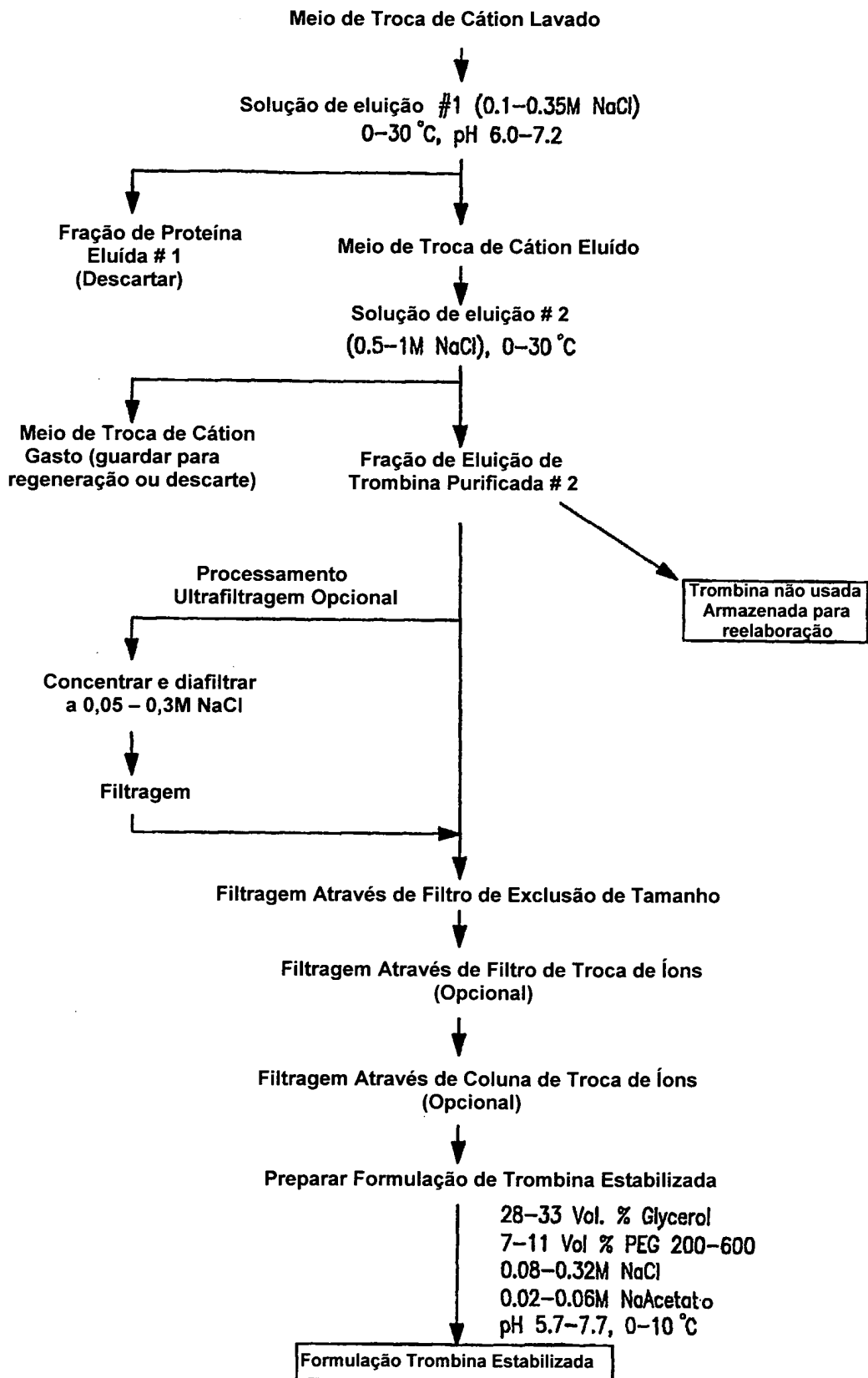


FIG. 3 (con't)

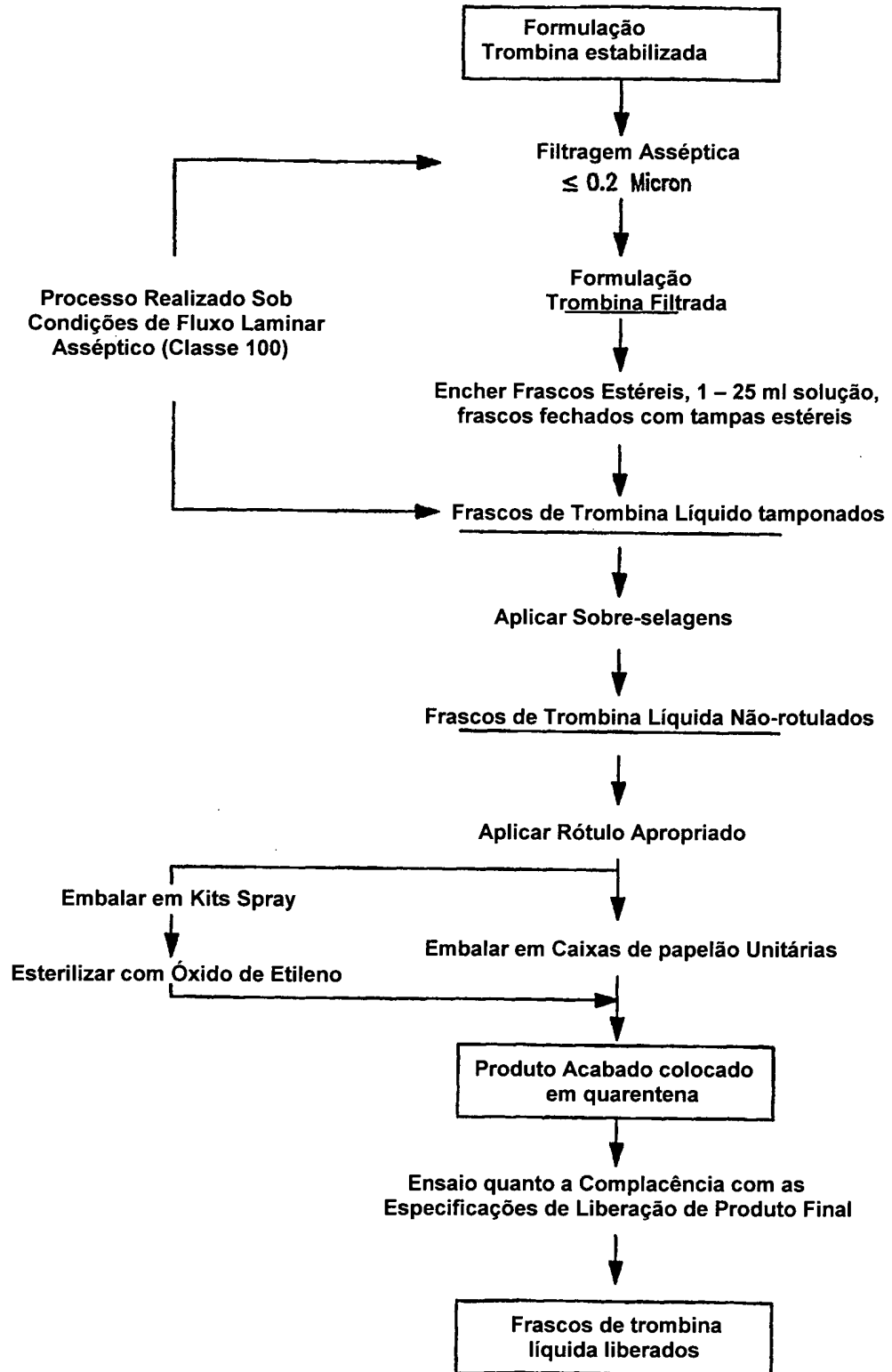


FIG. 3 (con't)

RESUMO

“MÉTODO PARA PREPARAR UMA TROMBINA, COMPOSIÇÃO DE TROMBINA, FORMULAÇÃO DE TROMBINA LÍQUIDA ESTABILIZADA, MÉTODO PARA ADMINISTRAR A FORMULAÇÃO DE TROMBINA ESTABILIZADA, E, KIT”

A invenção refere-se a composições de trombina com reduzidos níveis de impurezas de elevado peso molecular. Em particular, os níveis do fator Va, príons e/ou agentes virais são grandemente reduzidos. Esta invenção também refere-se genericamente a métodos para a preparação de trombina tendo um alto grau de pureza e elevada atividade específica. Mais especificamente, a invenção abrange etapas para excluir impurezas de elevado peso molecular das preparações de trombina por filtração de exclusão de tamanho. Em formas de realização adicionais, a preparação da trombina adicionalmente inclui uma etapa de filtração de troca de íons. Os métodos da invenção são particularmente adequados para purificação de larga escala de trombina. Esta invenção também refere-se genericamente a formulações estabilizadas contendo composições de trombina. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a formulações líquidas estabilizadas contendo trombina tendo um alto grau de pureza e alta atividade específica e a métodos de produzir e utilizar tais formulações.

“MÉTODO PARA PREPARAR TROMBINA BOVINA RECUPERADA, E, MÉTODO PARA A PREPARARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE TROMBINA BOVINA PURIFICADA”

5 Este pedido é uma continuação em parte do Pedido de Patente dos Estados Unidos No. 11/140.374, depositado em 26 de maio de 2005, incorporado aqui por referência em sua totalidade. Este pedido incorpora por referência, em sua totalidade, o Pedido de Patente dos Estados Unidos de continuação em parte intitulado “Thrombin Purification”, depositado em 24 de maio de 2006. Este pedido reivindica prioridade para o Pedido de Patente 10 dos Estados Unidos No. 11/140.374, depositado em 26 de maio de 2005 e para o Pedido de Patente dos Estados Unidos de continuação em parte intitulado “Thrombin Purification”, depositado em 24 de maio de 2006.

1. CAMPO DA INVENÇÃO

15 A invenção refere-se genericamente a preparações de trombina purificada, substancialmente livres de impurezas de grande peso molecular, tais como fator Va, príons e/ou agentes virais, que contribuem para efeitos adversos nos pacientes. Esta invenção também refere-se a métodos para a preparação de trombina substancialmente livre de agentes virais, tendo um alto grau de pureza e alta especificidade específica. Mais particularmente, a 20 invenção abrange métodos compreendendo a exclusão de impurezas de elevado peso molecular de preparações de trombina. Esta invenção também refere-se genericamente a formulações de preparações de trombina tendo um alto grau de pureza.

2. FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

25 A trombina é uma enzima protolítica, que aparece no sangue em seguida à ativação do sistema de coagulação, como resultado da proteólise da protrombina. A trombina facilita a coagulação do sangue pela catalisador da conversão do fibrinogênio em fibrina, que forma os coágulos sangüíneos e

EXEMPLO 4-FILTRAGEM DE EXCLUSÃO DE TAMANHO SOB VÁRIAS CONDIÇÕES

Este exemplo também utiliza filtragem de exclusão de tamanho empregando-se filtros Pall Ômega 100K VR. Três filtrações são realizadas em uma pressão de alimentação de 8 psi (0,56 kg/cm²) e três são realizadas em uma pressão de alimentação de 12 psi (0,84 kg/cm²). Os parâmetros do filtro diminuídos proporcionalmente são escolhidos para manter o volume para área de superfície de filtro constante e assegurar operação na faixa de pressão de alimentação especificada.

Cada filtragem é realizada com um novo filtro Pall Ômega 100K VR de 0,1 pé² (0,929 dm²) e todas as filtrações são realizadas em um ambiente frio (\leq cerca de 80°C). Um medidor de fluxo é incluído no sistema para melhorar a monitorar o fluxo cruzado durante a filtragem. O fluxômetro é calibrado no recinto frio antes do uso.

A Tabela 9 resume as condições e parâmetros das seis filtrações. Para as filtrações de 8 psi (0,56 kg/cm²), a atividade da trombina do material de partida medeia 22,091 u/ml e para o pool de filtrado final medeia 11,130 u/ml. A percentagem resultante de recuperação de trombina após 6 ciclos de realização de diafiltragem medeia 86%. As filtrações realizadas em uma pressão de alimentação de 8 psi (0,56 kg/cm²) mostram ligeiramente mais recuperação de trombina do que a 12 psi (0,84 kg/cm²).

Tabela 9-Resumo de resultados de filtragem e recuperação de trombina

	Filtragem # 1	Filtragem# 2	Filtragem# 3	Filtragem # 4	Filtragem # 5	Filtragem # 6
Pressão de alimentação alvo	8	8	8	12	12	12
Volume de trombina (mL)	400	400	400	400	400	400
Volume de reforço (mL)	20	20	20	NA	NA	NA
Volume total amostra pré-filtragem Total (mL)	420	420	420	400	400	400
Atividade da amostra pré-filtragem (u/mL)	22,696	24,177	19,399	21,559	21,559	20,747
Atividade total da amostra pré-filtragem (u)	9,532,320	10,154,340	8,147,580	8,623,600	8,623,600	8,298,800

A Tabela 13 mostra os resultados da estabilidade durante 6 meses em temperatura ambiente ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) para a formulação da atual invenção.

Tabela 13-Formulações de trombina estabilizadas

Amostra	Reinv. do rótulo μ /frasco	Volume ml/frasco	Potência inicial μ /ml	3 mo. μ /ml	6 mo. μ /ml
1	5.000	5	1,661	1,613	1,611
2	20.000	20	1,661	1,727	1,672
3	5.000	5	1,486	1,451	1,327
4	20.000	20	1,486	1,483	1,492

5 A Tabela 14 mostra uma formulação de trombina, formulada para estabilidade melhorada, que foi submetida aos métodos de purificação da atual invenção.

Tabela 14-Formulações de trombina estabilizadas

Formulações estabilizadas de trombina	
Composição de trombina	NLT 1.400 unidades/ml
Glicerol	30% em volume
Polietileno glicol	10% em volume
Cloreto de sódio	Concentração 0.15-0.3M
Acetato de sódio	Concentração 0.025-0.05M
pH	$6,7 \pm 0,1$

10 A composição de trombina de massa não-estéril foi formulada a não menos do que 1400 unidades/ml pela adição de água para irrigação. Glicerol foi então adicionado a uma concentração aproximada de 30% em volume. Polietileno glicol 200-400 MW foi adicionado a uma concentração aproximada de 10% em volume. Cloreto de sódio foi adicionado até a concentração do cloreto de sódio ser de aproximadamente 0,15-0,3M e
15 acetato de sódio foi adicionado, até a concentração do acetato de sódio ser aproximadamente de 0,025-0,05M. O pH da solução de trombina foi ajustado a um pH de $6,7 \pm 0,1$ com ácido clorídrico diluído ou hidróxido de sódio. A formulação foi então colocada em teste de estabilidade a ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e testada quanto a potência em intervalos de tempo regulares. As amostras

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparar trombina bovina purificada, caracterizado pelo fato de compreender:

5 (a) aplicar uma preparação de trombina bovina a um filtro de exclusão de tamanho capaz de excluir impurezas que tenham um peso molecular maior do que 40 kDa; e

(b) recuperar a trombina bovina purificada.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a preparação de trombina bovina ser Thrombin-JMI[®].

10 3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de o filtro de exclusão de tamanho ser capaz de excluir impurezas que tenham pesos moleculares variando de 40 kDa e 300 kDa.

4. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de o filtro de exclusão de tamanho ser capaz de excluir impurezas
15 que tenham peso molecular de pelo menos 100 kDa.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de as impurezas na trombina bovina purificada recuperada serem reduzidas em pelo menos 80%.

20 6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de a trombina bovina purificada recuperada ser substancialmente livre de impurezas que tenham um peso molecular maior que 40 kDa.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de a trombina purificada recuperada ser
25 substancialmente livre de fator Va.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de o fator Va estar presente a menos que 0,4 µg/1000 unidades de trombina.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a

8, caracterizado pelo fato de a trombina bovina purificada recuperada ser substancialmente livre de príons.

5 10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de a trombina bovina purificada recuperada ter um valor de redução em log de príon de pelo menos 3,5 log.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de a trombina bovina purificada recuperada ser substancialmente livre de agentes virais.

10 12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de a composição de trombina bovina purificada recuperada ter um valor de redução em log de depuração viral de pelo menos cerca de 3,5 log.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de compreender ainda aplicar a trombina bovina purificada recuperada a um filtro de troca de íons.

15 14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de compreender ainda aplicar a preparação de trombina bovina a uma etapa de purificação cromatográfica antes de aplicar o filtro de exclusão de tamanho.

20 15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de a etapa de purificação cromatográfica compreender uma cromatografia por troca de cátion.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de a quantidade de trombina bovina purificada recuperada aplicada ao filtro de exclusão de tamanho ser de pelo menos 15 L.

25 17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de a preparação de trombina bovina compreender pelo menos 300.000.000 unidades de trombina.

18. Método para a preparação de uma composição de trombina bovina purificada, substancialmente livre de impurezas que tenham

um peso molecular maior que 40 kDa e tenham uma atividade específica maior do que 1800 unidades de trombina por mg (u/mg) de proteína, caracterizado pelo fato de compreender:

5 (a) aplicar a preparação de trombina bovina que tenha cerca de 500 a 3000 unidades de trombina por mL (u/mL) da preparação a uma cromatografia por troca de cátion para obter uma composição de trombina bovina pré-purificada que tenha uma atividade específica maior do que 1500 u/mg de proteína;

10 (b) aplicar a composição de trombina bovina pré-purificada da etapa (a) a um filtro de exclusão de tamanho capaz de excluir impurezas que tenham um peso molecular maior que 40 kDa para obter uma composição de trombina bovina purificada, substancialmente livre de impurezas que tenham um peso molecular maior que 40 kDa, e tenha uma atividade específica maior do que 1800 u/mg de proteína; e opcionalmente

15 (c) aplicar a composição de trombina bovina purificada da etapa (b) a uma filtração por troca de ânion.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de a filtração por exclusão de tamanho ser capaz de excluir impurezas que tenham um peso molecular maior que 50 kDa.

20 20. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de a filtração por exclusão de tamanho ser capaz de excluir impurezas que tenham um peso molecular maior que 100 kDa.

25 21. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de a filtração por exclusão de tamanho ser capaz de excluir impurezas que tenham um peso molecular variando de 40 kDa a 300 kDa.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 21, caracterizado pelo fato de a composição de trombina bovina purificada ter uma atividade específica entre cerca de 1800 e cerca de 3000 u/mg de proteína.

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 21, caracterizado pelo fato de a composição de trombina bovina purificada ter uma atividade específica entre cerca de 2300 e cerca de 2700 u/mg de proteína.

5 24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 23, caracterizado pelo fato de a composição de trombina bovina purificada ser substancialmente livre de fator Va.

10 25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de o fator Va estar presente a menos que 0,4 µg/1000 unidades de trombina.

26. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 25, caracterizado pelo fato de a composição de trombina bovina purificada ser substancialmente livre de príons.

15 27. Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de a composição de trombina bovina purificada ter um valor de redução em log de depuração de príon de pelo menos cerca de 3,5 log.

28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 27, caracterizado pelo fato de a composição de trombina bovina purificada ser substancialmente livre de agentes virais.

20 29. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de a composição de trombina bovina purificada recuperada ter um valor de redução em log de depuração viral de pelo menos cerca de 3,5 log.

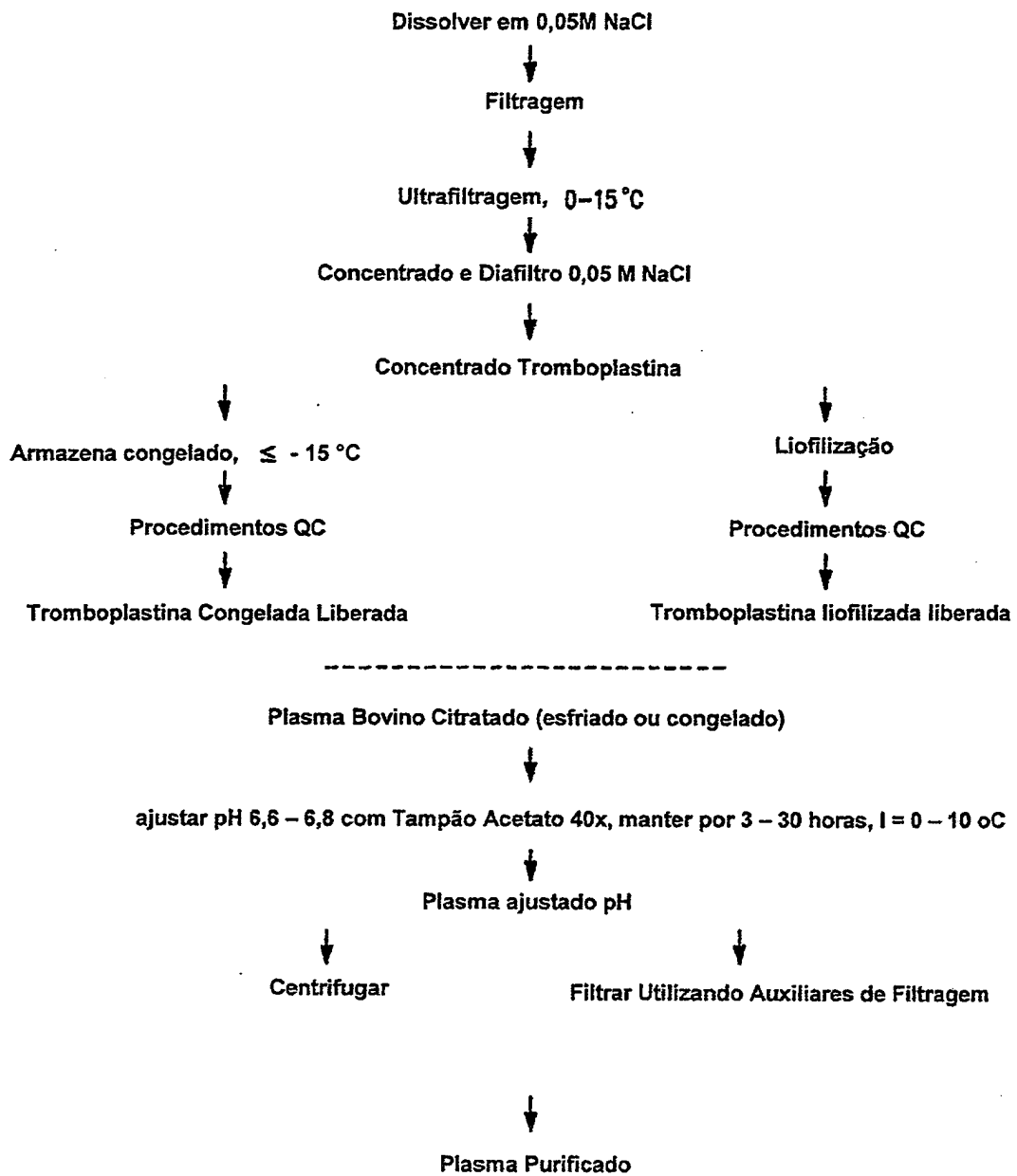


FIG. 1 (con't)

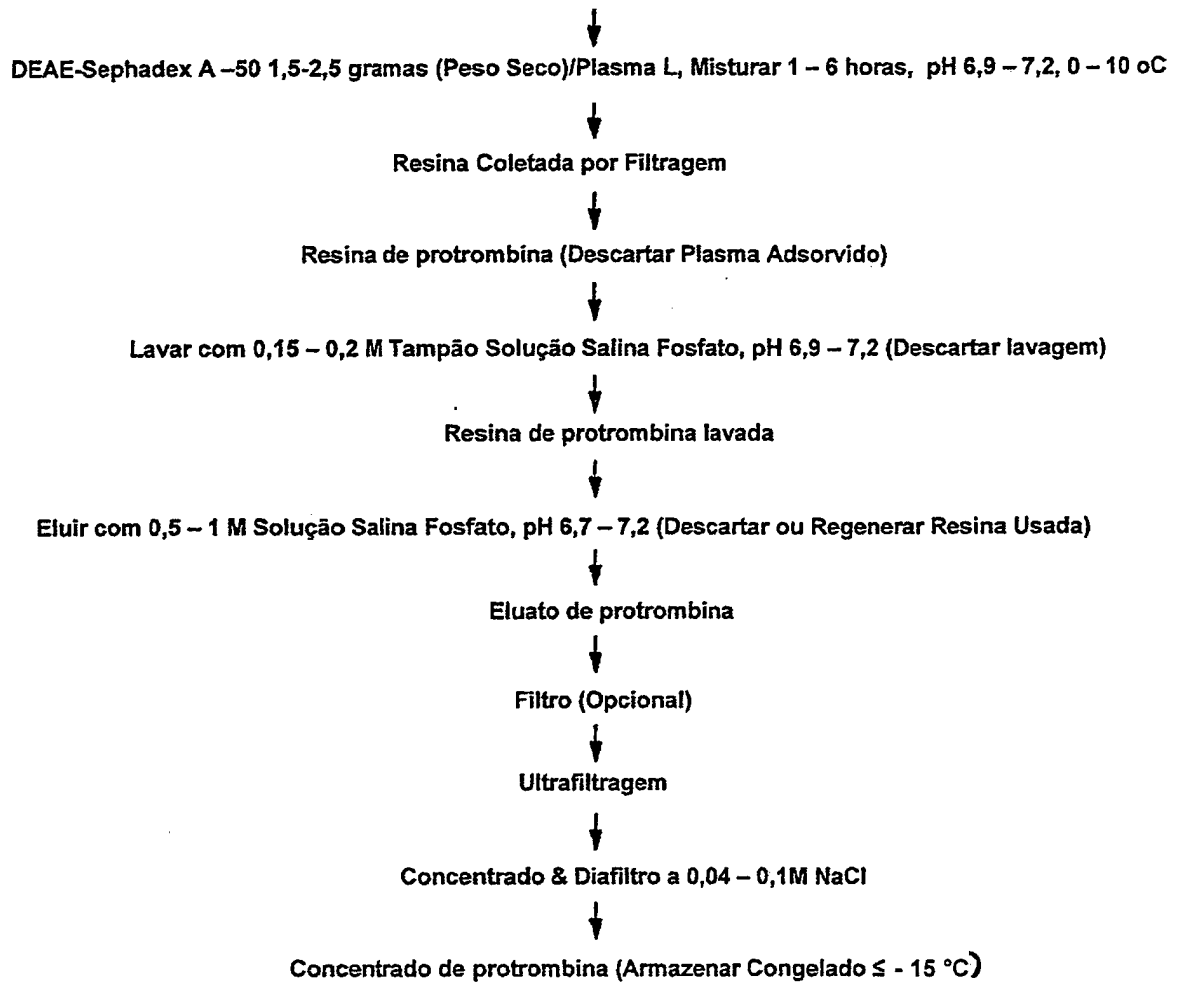


FIG. 1 (con't)

RESUMO

“MÉTODO PARA PREPARAR TROMBINA BOVINA RECUPERADA, E, MÉTODO PARA A PREPARARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE TROMBINA BOVINA PURIFICADA”

5 A invenção refere-se a composições de trombina com reduzidos níveis de impurezas de elevado peso molecular. Em particular, os níveis do fator Va, príons e/ou agentes virais são grandemente reduzidos. Esta invenção também refere-se genericamente a métodos para a preparação de trombina tendo um alto grau de pureza e elevada atividade específica. Mais
10 especificamente, a invenção abrange etapas para excluir impurezas de elevado peso molecular das preparações de trombina por filtragem de exclusão de tamanho. Em formas de realização adicionais, a preparação da trombina adicionalmente inclui uma etapa de filtragem de troca de íons. Os métodos da invenção são particularmente adequados para purificação de larga escala de
15 trombina. Esta invenção também refere-se genericamente a formulações estabilizadas contendo composições de trombina. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a formulações líquidas estabilizadas contendo trombina tendo um alto grau de pureza e alta atividade específica e a métodos de produzir e utilizar tais formulações.