

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 045**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2019 PCT/IB2019/000234**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2019 WO19171173**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2019 E 19727055 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2024 EP 3761956**

54 Título: **Proceso para reducir la endotoxina presente en la gelatina**

30 Prioridad:

08.03.2018 US 201862640394 P

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

14.10.2024

73 Titular/es:

**CATALENT U.K. SWINDON ZYDIS LIMITED
(100.0%)
Frankland Road, Blagrove
Swindon, Wiltshire SN5 8YG, GB**

72 Inventor/es:

**WONG, YIK TENG;
SHIRKHANI, KHOJASTEH;
POWE, AMI;
STEWART, SARAH y
SMARDON, CHARLI**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 982 045 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso para reducir la endotoxina presente en la gelatina

5 REFERENCIAS A OTRAS SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE. UU. n.º 62/640,394, presentada el 8 de marzo de 2018.

10 CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

[0002] La presente divulgación se refiere a un proceso para reducir la endotoxina presente en la gelatina. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a un proceso para reducir la endotoxina presente en la gelatina filtrando una solución de sal de gelatina usando para ello el intercambio aniónico y desalando la solución de sal de gelatina filtrada.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] Las vacunas se administran tradicionalmente por vía parenteral a través de vías intermusculares, interdérmicas o subcutáneas. Sin embargo, la administración de vacunas por vía mucosa (a través de la mucosa bucal, sublingual, nasal, oral o vaginal) ha suscitado un interés cada vez mayor como medio para inducir una respuesta inmunitaria de anticuerpos local y distante, así como una respuesta inmunitaria sistémica. Además, la administración de vacunas a través de las mucosas mediante formas de dosificación sólidas (por ejemplo, comprimidos bucales/sublinguales, comprimidos o cápsulas orales, insertos vaginales) ofrece varias ventajas, como el potencial de inmunización masiva y la capacidad independiente de la cadena de frío. Asimismo, la administración de vacunas por vía mucosa puede resultar adecuada para pacientes que tienen fobia a las inyecciones, de manera que el paciente puede autoadministrarse la vacuna. La vía bucal/sublingual se ha utilizado durante muchos años para administrar fármacos y moléculas pequeñas al torrente sanguíneo, pero su aplicación como medio de administración de vacunas por vía mucosa ha recibido poca atención.

[0004] Una de las principales consideraciones para la administración de vacunas a través de las mucosas es el nivel de endotoxina presente en la composición farmacéutica. La endotoxina es un lipopolisacárido complejo ('LPS') que se encuentra en la membrana externa de las bacterias gramnegativas y que se libera tras la muerte o lisis de la célula. La endotoxina puede causar cambios fisiológicos en el cuerpo humano y, por lo tanto, puede afectar a los sistemas de órganos y alterar los sistemas de mediación humanos humorales y celulares. Para los productos de administración parenteral, existe un límite estricto en lo que respecta al contenido de endotoxina, ya que el cuerpo humano sólo puede tolerar una pequeña cantidad de endotoxina en la sangre.

[0005] Sin embargo, normalmente existe un pequeño problema de seguridad al ingerir productos bucales/sublinguales que contienen altos niveles de endotoxina, ya que la boca está colonizada por bacterias aeróbicas y anaeróbicas. Por ejemplo, un adulto sano con una buena higiene bucal tiene un nivel medio de endotoxinas derivadas de la microflora bucal de aproximadamente 2 unidades de endotoxinas (UE)/ml de saliva (1 ng = 10 UE). Así, la producción diaria de endotoxina es superior a 1000 UE/día para un adulto sano con una buena higiene bucal. Sin embargo, en lo que respecta a la administración de vacunas, la endotoxina puede eliminar, desactivar o amplificar la respuesta inmunitaria en función de la ubicación de la mucosa.

El documento EP 1 829 946 A1 se refiere a un método para fabricar gelatina con un contenido de endotoxina reducido.

El documento US 4 374 063 A se refiere a un proceso para preparar una solución de gelatina esencialmente libre de pirógenos a partir de pieles de vacuno y/o curtidos.

El documento JP 2007 211170 A se refiere a un método de producción para obtener una gelatina con poca endotoxina que tiene un contenido de endotoxina que se ha reducido hasta una cantidad que pueda usarse en el cuerpo sin alterar en gran medida la estructura molecular de la gelatina.

55 RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] El nivel de endotoxina en los productos bucales/sublinguales utilizados para la vacunación (especialmente contra infecciones) puede influir positivamente o negativamente en la respuesta inmunitaria. Además, para la administración por vía mucosa, a menudo se añaden adyuvantes para mejorar la respuesta inmunitaria. La presencia de endotoxinas puede enmascarar positivamente o negativamente los beneficios de un adyuvante determinado. Asimismo, se ha sugerido que la endotoxina provoca tolerancia hacia los antígenos a nivel sublingual, lo que podría contrarrestar la función inmunoestimuladora del adyuvante. Por consiguiente, las formas de dosificación como los comprimidos bucales/sublinguales (utilizados para la administración de vacunas a través de las mucosas para tratar infecciones) deben tener un contenido bajo de endotoxinas.

[0007] Muchas formas de dosificación utilizan formadores de matrices para proporcionar propiedades dispersables orales. La gelatina es uno de los principales formadores de matrices. La gelatina se deriva de la hidrólisis del colágeno en condiciones ácidas o alcalinas. Al ser un producto de origen natural, contiene cantidades altas y variables de endotoxinas. Por ejemplo, en la gelatina de pescado, el nivel de endotoxina puede ser de entre 6000 y 30 000 UE/gramo de gelatina. Otras gelatinas pueden tener un contenido de endotoxinas de al menos aproximadamente 3000 UE/g, aproximadamente 4000 UE/g, aproximadamente 5000 UE/g, aproximadamente 6000 UE/g, aproximadamente 10000 UE/g, aproximadamente 12 000 UE/g, aproximadamente 14 000 UE/g, aproximadamente 15 000 UE/g, aproximadamente 20 000 UE/g, aproximadamente 25 000 UE/g o aproximadamente 30 000 UE/g.

[0008] Así, para producir formas de dosificación hechas de gelatina que tengan un bajo contenido de endotoxina, los solicitantes han descubierto un proceso que reduce la cantidad de endotoxina presente en la gelatina. La gelatina resultante con bajo contenido de endotoxinas puede usarse después como formador de matrices para crear diversas formas de dosificación. Además, la gelatina baja en endotoxinas se puede usar en muchas otras áreas, como los gránulos en forma de barra y las cápsulas blandas.

[0009] En el presente documento se proporcionan diversos procesos para reducir el nivel de endotoxina en la gelatina y la gelatina resultante con un bajo contenido de endotoxina. El proceso incluye disolver una sal en una solución de gelatina y filtrar la solución de sal de gelatina usando intercambio aniónico para reducir el nivel de endotoxina. Tras reducir el nivel de endotoxina de la solución de sal de gelatina, se desala la solución de sal de gelatina baja en endotoxinas, produciendo así una solución de gelatina baja en endotoxinas. La solución de gelatina baja en endotoxinas puede usarse en diversas composiciones farmacéuticas, incluidas las vacunas.

[0010] La invención se refiere a un método para reducir la endotoxina presente en la gelatina, que comprende disolver una sal en una solución de gelatina que comprende gelatina y un solvente para formar una solución de sal de gelatina, de manera que el contenido de endotoxina de la gelatina es de al menos 6000 UE/g y de manera que la concentración de sal en la solución de sal de gelatina es de 125-300 mM; filtrar la solución de sal de gelatina a través de un adsorbedor de intercambio aniónico de modo que la solución de sal de gelatina filtrada tenga un contenido de endotoxina inferior a 2500 UE/g; y desalar la solución de sal de gelatina filtrada para obtener una solución de gelatina baja en endotoxinas que tiene un contenido de endotoxina inferior a 2500 UE/g. En algunas realizaciones, la concentración de sal de la solución de sal de gelatina es de aproximadamente 145-155 mM. En algunas realizaciones, la solución de gelatina es una solución de gelatina al 1-20 % p/p. En algunas realizaciones, la sal es cloruro de sodio. En algunas realizaciones, la gelatina es gelatina de pescado. En algunas realizaciones, disolver la sal en la solución de gelatina comprende calentar la solución de gelatina a 50-70°C. En algunas realizaciones, el solvente es agua. En algunas realizaciones, el contenido de endotoxina de la solución de sal de gelatina y la solución de gelatina baja en endotoxinas es inferior a 1000 UE/g. En algunas realizaciones, filtrar la solución de sal de gelatina a través de un adsorbedor de intercambio aniónico puede reducir el contenido de endotoxina de la solución en al menos un 95%. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 85% del contenido de gelatina se recupera en la solución de sal de gelatina filtrada después de filtrar la solución de sal de gelatina a través de un adsorbedor de intercambio aniónico. En algunas realizaciones, el método también incluye eliminar el solvente de la solución de gelatina con bajo contenido de endotoxinas para formar una gelatina con bajo contenido de endotoxinas que tiene un contenido de endotoxinas inferior a 2500 UE/g.

[0011] En algunas realizaciones, la desalación de la solución de sal de gelatina filtrada se logra mediante un proceso de diafiltración. En algunas realizaciones, el proceso de diafiltración comprende diluir la solución de sal de gelatina filtrada con un segundo solvente y filtrar la solución de sal de gelatina filtrada diluida para obtener una solución de gelatina filtrada diluida. En algunas realizaciones, la solución de sal de gelatina filtrada diluida se filtra hasta que la conductividad de la solución de gelatina filtrada diluida sea de menos del 25% de la conductividad de la solución de gelatina. En algunas realizaciones, la proporción entre la solución de sal de gelatina filtrada y el segundo solvente es de 1:1-1:4. En algunas realizaciones, el segundo solvente se elimina de la solución de gelatina filtrada diluida para obtener la solución de gelatina baja en endotoxinas. En algunas realizaciones, el segundo solvente se elimina de la solución de gelatina filtrada diluida hasta que el peso de la solución de gelatina filtrada diluida sea de menos del 5% del peso de la solución de sal de gelatina filtrada. En algunas realizaciones, el segundo solvente incluye el agua.

[0012]

[0013]

[0014] La invención se refiere a una forma de dosificación para administrar un ingrediente farmacéuticamente activo preparado mediante un método que se describe en la reivindicación 13.

[0015] Gracias a la siguiente descripción detallada, otras ventajas adicionales resultarán evidentes para los expertos en la técnica de este campo. Los ejemplos y las descripciones del presente documento deben considerarse meramente ilustrativos y no limitativos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

- [0017] Se describen diversas realizaciones ejemplares tomando como referencia las Figuras adjuntas, de manera que:
- 5 [0018] La Figura 1 ilustra un diagrama de flujo de un método para reducir la endotoxina presente en la gelatina que se desvela en el presente documento.
- [0019] La Figura 2 ilustra un diagrama de flujo de un paso para obtener una solución de sal de gelatina.
- 10 [0020] La Figura 3 ilustra un diagrama de flujo de un paso para filtrar una solución de sal de gelatina usando intercambio aniónico para eliminar endotoxinas que se desvela en el presente documento.
- [0021] La Figura 4 es un gráfico que ilustra los resultados experimentales del efecto que tiene la concentración de sal de la solución de sal de gelatina sobre la eliminación de endotoxinas.
- 15 [0022] La Figura 5 ilustra un diagrama de flujo de un paso para desalar la solución de sal de gelatina filtrada que se desvela en el presente documento.
- [0023] La Figura 6 es un gráfico de la endotoxina en fracciones de muestra vs. el volumen acumulado de la solución de sal de gelatina filtrada en el Ejemplo 1.
- 20 [0024] La Figura 7 es un gráfico de la endotoxina en fracciones de muestra vs. el volumen acumulado de la solución de sal de gelatina filtrada en el Ejemplo 2.
- [0025] La Figura 8 es un gráfico de la endotoxina en fracciones de muestra vs. el volumen acumulado de la solución de sal de gelatina filtrada en el Ejemplo 3.
- 25 [0026] La Figura 9A es una representación esquemática con una imagen de una pastilla completamente humedecida.
- [0027] La Figura 9B es una representación esquemática con una imagen de una pastilla con grumos duros.
- 30 [0028] La Figura 9C es una representación esquemática con una imagen de una pastilla con una película de la matriz de la formulación colapsada que se forma en la superficie de la pastilla liofilizada (piel).
- [0029] En las Figuras, a menos que se indique lo contrario, los números de referencia similares corresponden a componentes similares. Además, las Figuras no están dibujadas a escala.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 40 [0030] Los procesos desvelados en el presente documento pueden crear gelatina con bajos niveles de endotoxina. Después, la gelatina baja en endotoxinas se puede usar para una variedad de aplicaciones, que incluyen -pero no se limitan a- un formador de matrices en una forma de dosificación farmacéutica. La Figura 1 ilustra un diagrama de flujo del método 100 para reducir la endotoxina presente en la gelatina.
- 45 Preparación de una solución de sal de gelatina
- [0031] El primer paso 101 incluye preparar una solución de sal de gelatina disolviendo sal en una solución de gelatina. La Figura 2 ilustra un diagrama de flujo del paso 101 para disolver sal en una solución de gelatina. La solución de gelatina inicial puede tener un contenido de endotoxina equivalente al de la gelatina de la solución. Además, la solución de sal de gelatina también tendrá un contenido de endotoxina comparable al de la solución de gelatina inicial.
- 50 [0032] El paso 101 incluye disolver una gelatina en un solvente para formar una solución de gelatina. Preferiblemente, la gelatina se disuelve completamente en el solvente. Se puede facilitar la disolución de la gelatina en el solvente agitando y/o calentando la solución. En algunas realizaciones, la solución de gelatina se puede calentar a aproximadamente 40-80 °C, aproximadamente 50-70 °C, aproximadamente 55-65 °C, aproximadamente 58-62 °C o aproximadamente 60 °C para facilitar la disolución de la gelatina en el solvente. Una vez que la gelatina se ha disuelto completamente en el solvente, la solución de gelatina puede enfriarse a temperatura ambiente.
- 55 [0033] En algunas realizaciones, la gelatina puede ser una gelatina no gelificante; una gelatina gelificante, que incluye la gelatina de pescado, la gelatina bovina, la gelatina porcina y la gelatina de pollo; o una combinación de las mismas. Si bien los ejemplos que se desvelan más adelante utilizan gelatina de pescado como gelatina modelo, los principios establecidos para los procesos desvelados en el presente documento pueden aplicarse a otros tipos de gelatina y a los respectivos grados de gelatina disponibles dentro de cada tipo de gelatina. En algunas realizaciones, el solvente puede ser agua (incluida el agua purificada).
- 60 [0034] La concentración de gelatina en la solución de gelatina puede variar dependiendo del uso final de la gelatina.
- 65

Así, la cantidad específica de gelatina y la cantidad específica de solvente utilizadas pueden variar dependiendo de la concentración de gelatina deseada. En algunas realizaciones, la concentración de gelatina en la solución de gelatina puede ser de aproximadamente un 1-20% p/p, aproximadamente un 2-15% p/p, aproximadamente un 3-12% p/p, aproximadamente un 5-12% p/p, aproximadamente un 8-12% p/p o aproximadamente un 10-12% p/p.

[0035] Antes de añadir la sal a la solución de gelatina, se puede medir la conductividad de la solución de gelatina. Esta medición de la conductividad previa a la adición de sal puede resultar útil al comparar la solución final de gelatina baja en endotoxinas después del proceso de desalación. Además, la conductividad de la solución de sal de gelatina también se puede medir antes del paso para reducir la endotoxina.

[0036] Tal y como se muestra en la Figura 2, la gelatina se puede disolver completamente en el solvente para formar la solución de gelatina. La disolución de la gelatina se puede facilitar agitando y calentando la solución de gelatina. Se puede disolver sal en la solución de gelatina para formar una solución de sal de gelatina.

[0037] En algunas realizaciones, la sal puede ser cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de litio, cloruro de calcio, otras sales de cloruro o combinaciones de los mismos.

[0038] Como se describe con más detalle más adelante, los solicitantes descubrieron que la concentración de la sal en la solución de sal de gelatina desempeña un papel crucial en el proceso de intercambio aniónico en el paso 102 para eliminar la endotoxina de la gelatina. Más específicamente, los solicitantes descubrieron que realizar el intercambio aniónico sin usar una sal en la solución de gelatina puede hacer que la gelatina bloquee/obstruya los filtros utilizados durante el proceso de intercambio aniónico del paso 102.

[0039] Además, tal y como se explica más adelante en la descripción del paso 102, los solicitantes descubrieron que la concentración de sal específica tiene un impacto directo en el paso de eliminación de endotoxinas. Así, la concentración de sal en la solución de sal de gelatina es de 125-300 mM. La concentración de sal en la solución de sal de gelatina puede ser de aproximadamente 125-175 mM, aproximadamente 140-160 mM, aproximadamente 145-155 mM o aproximadamente 150 mM.

Reducción de la endotoxina mediante filtración de la solución de sal de gelatina usando el intercambio aniónico

[0040] Después de la preparación de la solución de sal de gelatina, la endotoxina se puede eliminar de la gelatina en el paso 102. La Figura 3 ilustra un diagrama de flujo del paso 102 para filtrar la solución de sal de gelatina usando el intercambio aniónico ('AEX'). Los solicitantes descubrieron que utilizando los principios de la cromatografía de intercambio aniónico se puede eliminar la endotoxina de la solución de gelatina. La cromatografía de intercambio aniónico propicia la separación de las moléculas en función de su carga. Más específicamente, la cromatografía de intercambio aniónico utiliza una resina de intercambio iónico cargada positivamente con afinidad por las moléculas que tienen cargas superficiales netas negativas. Las moléculas de endotoxina tienen una carga neta negativa. Por consiguiente, la endotoxina puede unirse a la resina de intercambio iónico cargada positivamente y eliminarse de la solución de sal de gelatina.

[0041] Tal y como se ha explicado anteriormente, los solicitantes descubrieron que durante la reducción de la endotoxina, una solución de gelatina sin sal puede bloquear/obstruir los filtros del dispositivo de intercambio aniónico. Sin limitarse a ninguna teoría, los solicitantes creen que la sal en la solución de gelatina puede modificar la carga de la molécula de gelatina hasta un nivel suficiente, reduciendo así la adhesión de la gelatina al dispositivo de intercambio aniónico. De este modo, la solución de sal de gelatina puede pasar a través del dispositivo de intercambio aniónico como filtrado, mientras que las endotoxinas se quedan atrás.

[0042] El intercambiador aniónico puede ser un adsorbedor de membrana (por ejemplo, el comercialmente disponible Sartobind Q de Sartorius Stedim, y Mustang E de Pall Life Sciences) o una resina (por ejemplo, la resina Fractogel EMD TMAE Hicap (M) disponible comercialmente y la resina Eshmuno Q de Merk Millipore). Además, los adsorbentes de membrana están disponibles en una variedad de tamaños diferentes. Por ejemplo, el Sartobind Q tiene varios tamaños, incluido un volumen de lecho de 1 ml, 7 ml, 75 ml, 159 ml, 1,2 l y 5 l. La selección del tamaño del adsorbedor puede basarse en el volumen que se va a filtrar, el punto de ruptura de la endotoxina para la solución que se va a tratar y/o diversas condiciones de procesamiento.

[0043] Aunque la endotoxina puede unirse a la resina de intercambio iónico cargada positivamente en el dispositivo de intercambio aniónico, los solicitantes descubrieron que la concentración de sal de la solución de gelatina puede afectar considerablemente a la eliminación de la endotoxina a través del dispositivo de intercambio aniónico. A fin de determinar el impacto que tiene la concentración de sal en la eliminación de la endotoxina, los solicitantes prepararon una solución de agua purificada con gelatina de pescado al 10 % p/p con concentraciones variables de cloruro de sodio y las filtraron usando un Sartobind Q 1 mL Nano con un volumen de lecho de 1 mL. A continuación, los solicitantes midieron el contenido de endotoxina y el contenido de gelatina en la solución de sal de gelatina antes y después de la filtración. Los resultados del efecto de la concentración de sal sobre la eliminación de la endotoxina en la solución de sal de gelatina se muestran en la siguiente Tabla 1 y en la Figura 4.

TABLA 1

	Solución pre/post filtrada	Contenido de endotoxina (UE/g)	Contenido de gelatina (% p/p)
5	(10% de gelatina)	7000	10,5; 10,4
	Pre Filtración (10% de gelatina + 150 mM NaCl)	4140	10,3; 10,3
10	Post Filtración (10% de gelatina + 150 mM NaCl)	191	10,1; 10,1
	Pre Filtración (10% de gelatina + 250 mM NaCl)	5760	10,0; 10,2
15	Post Filtración (10% de gelatina + 250 mM NaCl)	464	10,6; 10,7
	Pre Filtración (10% de gelatina + 300 mM NaCl)	4610	10,3; 10,6
20	Post Filtración (10% de gelatina + 300 mM NaCl)	441	10,5; 10,4

25 **[0044]** Tal y como se muestra en la Figura 4 y en la anterior Tabla 1, los solicitantes descubrieron que cuando la concentración de sal de la solución de gelatina de pescado y NaCl es de aproximadamente 150 mM, el filtro puede obtener la mayor reducción del contenido de endotoxina en la solución. Cuando la concentración de sal es mucho mayor que 150 mM, se puede eliminar menos endotoxina. Además, tener una concentración de sal mucho menor que 150 mM puede hacer que la gelatina obstruya/bloquee el dispositivo de intercambio aniónico.

30 **[0045]** Después de reducir la endotoxina, se puede medir la conductividad de la solución de sal de gelatina filtrada. En algunas realizaciones, el paso de reducción de la endotoxina puede reducir el contenido de endotoxina de la solución de gelatina en al menos aproximadamente un 75%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 95%, aproximadamente un 98% o aproximadamente un 99%.

35 **[0046]** El nivel de endotoxina en la solución de sal de gelatina filtrada es inferior a 2500 UE/g. El nivel de endotoxina en la solución de sal de gelatina filtrada puede ser inferior a aproximadamente 2000 UE/g, aproximadamente 1500 UE/g, aproximadamente 1000 UE/g, aproximadamente 750 UE/g, aproximadamente 500 UE/g, aproximadamente 250 UE/g, aproximadamente 200 UE/g, aproximadamente 150 UE/g o aproximadamente 100 UE/g. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 98% o aproximadamente el 99% del contenido de gelatina inicial se recupera después del paso de reducción de la endotoxina. Esto se puede evaluar comparando la concentración de gelatina antes y después de la filtración de intercambio aniónico.

45 Desalación de la solución de sal de gelatina filtrada

50 **[0047]** Después de que la endotoxina se haya reducido en la solución de sal de gelatina, la sal que se añadió en el paso 101 debe eliminarse o reducirse en el paso 103. La Figura 5 ilustra un diagrama de flujo de un paso para desalar la solución de sal de gelatina filtrada que se desvela en el presente documento. Uno de los métodos mediante los que se puede eliminar la sal de la solución de sal de gelatina es la diafiltración. La diafiltración es un proceso que provoca la eliminación de la sal de una solución en función del tamaño molecular utilizando filtros permeables a las micromoléculas. A fin de favorecer la diafiltración, la solución de sal de gelatina se puede diluir aún más con agua para reducir su viscosidad, particularmente cuando la solución tiene un alto contenido de gelatina. El agua añadida se puede eliminar posteriormente mediante un paso de concentración. En algunas realizaciones, la sal se puede eliminar sin diluir la solución de sal de gelatina con agua y, por lo tanto, no se requiere un paso de concentración posterior; es el caso, por ejemplo, de una solución de sal de gelatina con un menor contenido de gelatina.

60 **[0048]** La solución de sal de gelatina filtrada se puede introducir en un sistema de diafiltración. Los ejemplos de sistemas de diafiltración incluyen -pero no se limitan a- el sistema de filtración de flujo cruzado Sartoflow Advanced de Sartorius Stedim, el sistema KMPi TFF de Spectrum Labs (Repligen) o el sistema Cogent MI TFF de Merck. El peso de la solución de sal de gelatina filtrada y la conductividad se pueden medir antes de la diafiltración.

65 **[0049]** En algunas realizaciones, la solución de sal de gelatina filtrada del paso de reducción de endotoxinas se puede diluir con un solvente. En algunas realizaciones, el solvente puede ser agua (incluida el agua purificada). La proporción de la solución de sal de gelatina filtrada con respecto al solvente puede ser de aproximadamente 1:1-1:6, aproximadamente 1:1-1:5, aproximadamente 1:1-1:4, aproximadamente 1:1-1:3, aproximadamente 1:1-1:2, o aproximadamente 2:1-1:1. En algunas realizaciones, la proporción entre la solución de sal de gelatina filtrada y el

solvente puede depender de la concentración de gelatina en la solución de sal de gelatina filtrada. La solución de sal de gelatina y la mezcla de solvente se pueden agitar y/o calentar para garantizar un mezclado suficiente.

5 **[0050]** Se puede medir la conductividad de la mezcla al inicio de la diafiltración. Además, la conductividad se puede monitorizar continuamente y la mezcla se puede agitar continuamente durante todo el proceso de diafiltración. La diafiltración se puede detener cuando la conductividad de la mezcla alcanza un valor relativamente similar o comparable al de la solución de gelatina original antes de la adición de sal en el paso 101. Un valor relativamente similar o comparable puede ser un valor que difiere aproximadamente un 25%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 15%, aproximadamente un 10%, aproximadamente un 5%, aproximadamente un 2% o aproximadamente un 1% con respecto al valor original.

15 **[0051]** Tras la eliminación de la sal, la solución de gelatina diluida puede someterse a un proceso de concentración. El proceso de concentración puede eliminar el exceso de solvente añadido durante la dilución antes de la diafiltración. El proceso de concentración se puede llevar a cabo mediante un sistema de concentración. Los ejemplos de sistemas de concentración incluyen -pero no se limitan a- el sistema de filtración de flujo cruzado Sartoflow Advanced de Sartorius Stedim, el sistema KMPi TFF de Spectrum Fabs (Repligen) o el sistema Cogent MI TFF de Merck. La concentración de la solución de gelatina diluida se puede detener cuando el peso de la solución de gelatina diluida alcanza un valor relativamente similar o comparable al de la solución de sal de gelatina filtrada previa a la dilución. Un valor relativamente similar o comparable puede ser un valor que está a menos de aproximadamente un 25%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 15%, aproximadamente un 10%, aproximadamente un 5%, aproximadamente un 2% o aproximadamente un 1% del valor original.

25 **[0052]** Después de la diafiltración, queda una solución de gelatina baja en endotoxinas. Además, la concentración o contenido de gelatina de esta solución de gelatina desalada resultante con bajo contenido de endotoxina puede tener un valor casi igual o relativamente similar al de la solución de sal de gelatina filtrada tras el paso de reducción de la endotoxina. Un valor relativamente similar o comparable puede ser un valor que está a menos de aproximadamente un 25%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 15%, aproximadamente un 10%, aproximadamente un 5%, aproximadamente un 2% o aproximadamente un 1% del valor original. La solución de gelatina baja en endotoxinas tiene un contenido de endotoxina de menos de 2500 UE/g. La solución de gelatina baja en endotoxinas puede tener un contenido de endotoxina de menos de aproximadamente 2000 UE/g, aproximadamente 1500 UE/g, aproximadamente 1000 UE/g, aproximadamente 750 UE/g, aproximadamente 500 UE/g, aproximadamente 250 UE/g, aproximadamente 200 UE/g, aproximadamente 150 UE/g o aproximadamente 100 UE/g. Así, el contenido de endotoxina tras el paso de eliminación de la endotoxina se puede mantener durante el proceso de diafiltración.

35 **[0053]** En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 98% o aproximadamente el 99% del contenido de gelatina inicial se recupera tras el paso de desalación. Esto se puede evaluar comparando la concentración de gelatina antes y después de la diafiltración. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 98% o aproximadamente el 99% del contenido de gelatina inicial se recupera tras los pasos de reducción de endotoxinas y desalación.

45 **[0054]** En algunas realizaciones, se puede eliminar el solvente de la solución de gelatina con la endotoxina reducida. Por ejemplo, la solución de gelatina con la endotoxina reducida se puede secar posteriormente hasta obtener una gelatina sólida con un bajo contenido de endotoxinas. Esta gelatina baja en endotoxinas puede estar en forma de polvo y puede usarse como materia prima en una variedad de aplicaciones, incluido un producto farmacéutico. En algunas realizaciones, el nivel de endotoxina en la gelatina baja en endotoxinas puede ser inferior a aproximadamente 3000 UE/g, aproximadamente 2500 UE/g, aproximadamente 2000 UE/g, aproximadamente 1500 UE/g, aproximadamente 1000 UE/g, aproximadamente 750 UE/g, aproximadamente 500 UE/g, aproximadamente 250 UE/g, aproximadamente 200 UE/g, aproximadamente 150 UE/g o aproximadamente 100 UE/g.

Uso en composiciones farmacéuticas

55 **[0055]** Las soluciones de gelatina bajas en endotoxinas pueden usarse en una variedad de composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, las soluciones de gelatina o la gelatina bajas en endotoxinas producidas en el presente documento se pueden usar en las formas de dosificación descritas en las patentes de EE. UU. n^{os} 4,371,516; 4,305,502; y 4,758,598 y las patentes de GB n^{os} 1548022 y 211423.

60 **[0056]** En algunas realizaciones, una forma de dosificación para administrar un ingrediente farmacéuticamente activo ('API') se puede preparar de la siguiente manera: (a) añadiendo una dosis de una formulación que comprende una gelatina a un molde preformado; y (b) liofilizando la formulación para formar la forma de dosificación que se disuelve.

65 **[0057]** Tal y como se utiliza en el presente documento, 'añadir una dosis de' se refiere a la deposición de una alícuota predeterminada de una solución o suspensión. Tal y como se utiliza en el presente documento, un 'molde preformado' es cualquier recipiente o compartimento adecuado en el que se pueda depositar una solución o suspensión acuosa y dentro del cual esta se pueda liofilizar posteriormente. En algunas realizaciones preferidas de la presente divulgación, el molde preformado es un envase tipo blíster con uno o más compartimentos de blíster.

5 [0058] La formulación del paso (a) puede incluir un agente formador de matrices. El agente formador de matrices puede ser cualquier agente formador de matrices no gelificante convencional. Los agentes formadores de matrices no gelificantes adecuados incluyen -sin limitaciones- gelatinas no gelificantes (incluida la gelatina baja en endotoxinas preparada de acuerdo con el proceso descrito anteriormente), almidones modificados, pululano, gelatina de pescado no gelificante, maltodextrinas, dextranos de bajo peso molecular, éteres de almidón, gomas de celulosa de peso molecular bajo a intermedio, y combinaciones de los mismos. El agente formador de matrices también puede ser cualquier agente formador de matrices gelificante convencional. Los agentes formadores de matrices gelificantes adecuados incluyen -sin limitaciones- gelatina gelificante (incluida la gelatina baja en endotoxinas preparada de acuerdo con el proceso descrito anteriormente), gomas de carragenano, ácido hialurónico, pectinas, almidones, carboximetilcelulosa sódica, agar, goma gellan, goma guar, goma de tragacantano, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, carbómero, poloxámero, ácido poliacrílico, alcohol de polivinilo, alginatos y ácido poliglicólico, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agente formador de matrices puede ser una combinación de un agente formador de matrices no gelificante y un agente formador de matrices gelificante. Una persona con habilidades comunes en la técnica de este campo puede determinar fácilmente las cantidades adecuadas de estos agentes formadores de matrices si así lo desea.

10 [0059] La formulación del paso (a) normalmente está en forma de solución o suspensión. Por consiguiente, en la formulación también está presente un solvente. Una persona con habilidades comunes en la técnica de este campo puede elegir fácilmente un solvente adecuado una vez que se conoce la composición final de la formulación, es decir, el ingrediente farmacéuticamente activo, el excipiente, etc., que van a estar presentes. Los solventes preferidos incluyen etanol, isopropanol, otros alcanos inferiores y agua, y, más preferiblemente, agua.

15 [0060] La formulación del paso (a) también puede contener un agente o excipiente farmacéuticamente aceptable adicional. Estos agentes o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen -sin limitaciones- azúcares, como manitol, dextrosa y lactosa, sales inorgánicas, como cloruro de sodio y silicatos de aluminio, gelatinas de origen mamífero, gelatina de pescado, almidones modificados, conservantes, antioxidantes, surfactantes, potenciadores de la viscosidad, agentes colorantes, agentes aromatizantes, modificadores del pH, edulcorantes, agentes enmascaradores del sabor, y combinaciones de los mismos. Los agentes colorantes adecuados incluyen óxidos de hierro rojos, negros y amarillos y tintes FD & C tales como FD & C Blue No. 2 y FD & C Red No. 40, y combinaciones de los mismos. Los agentes aromatizantes adecuados incluyen sabores de menta, frambuesa, regaliz, naranja, limón, pomelo, caramelo, vainilla, cereza y uva, y combinaciones de estos. Los modificadores del pH adecuados incluyen ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido maleico e hidróxido de sodio, y combinaciones de los mismos. Los edulcorantes adecuados incluyen aspartamo, acesulfamo K y taumatina, y combinaciones de los mismos. Los agentes enmascaradores del sabor adecuados incluyen bicarbonato de sodio, resinas de intercambio iónico, compuestos de inclusión de ciclodextrina, adsorbatos o activos microencapsulados, y combinaciones de los mismos. Una persona con habilidades comunes en la técnica de este campo puede determinar fácilmente las cantidades adecuadas de estos variados excipientes adicionales si así lo desea. El manitol, que es un compuesto orgánico con la fórmula (C₆H₈(OH)₆) y es generalmente conocido por los expertos en la técnica, es un agente farmacéuticamente aceptable adicional preferido.

20 [0061] La formulación del paso (a) también puede contener un ingrediente farmacéuticamente activo. Tal y como se utiliza en el presente documento, la expresión 'ingrediente farmacéuticamente activo' se refiere a un producto farmacéutico que puede usarse en el diagnóstico, cura, atenuación, tratamiento o prevención de una enfermedad. Para los fines de la presente divulgación se puede usar cualquier ingrediente farmacéuticamente activo. Obviamente, una persona con habilidades comunes en la técnica de este campo comprenderá que algunos ingredientes farmacéuticamente activos son más adecuados para usarse con el agente formador de matrices no gelificante de la formulación del paso (a) que con -por ejemplo- el agente formador de matrices gelificante del paso (b). Los ingredientes farmacéuticamente activos adecuados incluyen, sin limitaciones: analgésicos y agentes antiinflamatorios, antiácidos, antihelmínticos, agentes antiarrítmicos, agentes antibacterianos, anticoagulantes, antidepresivos, antidiabéticos, antidiarreicos, antiepilépticos, agentes antifúngicos, agentes antigota, agentes antihipertensivos, antipalúdicos, agentes antimigrañosos, agentes antimuscarínicos, agentes antineoplásicos e inmunosupresores, agentes antiprotazoarios, antirreumáticos, agentes antitiroideos, antivirales, ansiolíticos, sedantes, hipnóticos y neurolépticos, betabloqueantes, agentes inotrópicos cardíacos, corticosteroides, supresores de la tos, citotóxicos, descongestionantes, diuréticos, enzimas, agentes antiparkinsonianos, agentes gastrointestinales, antagonistas de los receptores de histamina, agentes reguladores de lípidos, anestésicos locales, agentes neuromusculares, nitratos y agentes antianginosos, agentes nutricionales, analgésicos opioides, vacunas orales, proteínas, péptidos y fármacos recombinantes, hormonas sexuales y anticonceptivos, espermicidas y estimulantes; y combinaciones de los mismos. Puede encontrarse una lista con ejemplos específicos de estos ingredientes activos en la patente de EE. UU. n.º 6,709,669. Cuando está presente, el ingrediente farmacéuticamente activo está presente en la formulación del paso (a) en una cantidad que es necesaria para producir el efecto fisiológico requerido, según lo establecido por los estudios clínicos. Una persona con habilidades comunes en la técnica de este campo puede determinar fácilmente una cantidad adecuada de ingrediente activo para incluirla en la forma de dosificación preparada de acuerdo con la presente divulgación.

25 [0062] La formulación del paso (a) se puede preparar mediante cualquier método convencional. Lo más habitual es que el agente formador de matrices, el solvente y los ingredientes opcionales se puedan mezclar a una temperatura determinada para formar una solución. En algunas realizaciones, el agente formador de matrices y el solvente pueden ser la solución de gelatina baja en endotoxinas preparada de acuerdo con el proceso descrito anteriormente. Cualquier ingrediente opcional se puede mezclar con la solución de gelatina. Después, la solución se puede enfriar, momento en

el que se puede añadir el ingrediente activo.

[0063] De manera similar, la dosificación del paso (a) se puede llevar a cabo mediante cualquier método o aparato conocido que incluya la dosificación secuencial descrita en el documento WO 2011/115969.

[0064] En el paso (b), las formulaciones dosificadas en el paso (a) se liofilizan para formar la forma de dosificación que se disuelve. Normalmente, las formulaciones dosificadas en los moldes preformados se congelan por cualquier medio conocido en la técnica de este campo, por ejemplo haciéndolas pasar a través de un túnel de nitrógeno líquido, preferiblemente durante entre aproximadamente un minuto y aproximadamente diez minutos. Una persona con habilidades comunes en la técnica de este campo determinará fácilmente la velocidad con la que hay que pasarlas a través del túnel. Después, las formulaciones dosificadas en los moldes preformados pueden liofilizarse a baja presión (es decir, al vacío).

[0065] Las formas de dosificación de la presente divulgación son formas de dosificación que se disuelven y, por consiguiente, tienen la clara ventaja de un tiempo de desintegración más rápido. La vía de administración puede ser oral, vaginal o nasal, aunque preferiblemente es oral. Una vez colocada en la cavidad bucal y en contacto con la saliva, una forma de dosificación puede desintegrarse en aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 180 segundos, en aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 120 segundos, en aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 60 segundos, preferiblemente en aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 30 segundos, más preferiblemente en aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 10 segundos y, lo más preferiblemente, en menos de aproximadamente 5 segundos.

[0066] En algunas realizaciones, las formas de dosificación pueden tener menos de aproximadamente 200 UE/forma de dosificación, menos de aproximadamente 150 UE/forma de dosificación; menos de aproximadamente 125 UE/forma de dosificación; menos de aproximadamente 100 UE/forma de dosificación; menos de aproximadamente 90 UE/forma de dosificación; menos de aproximadamente 75 UE/forma de dosificación; o menos de aproximadamente 50 UE/forma de dosificación.

Ejemplos

[0067] En primer lugar, todos los recipientes y elementos de laboratorio utilizados para fabricar la solución de sal de gelatina deben limpiarse y desinfectarse según sea necesario para minimizar la carga biológica y/o la introducción de endotoxina adicional.

Ejemplo 1

[0068] Se añadió una cantidad de gelatina de pescado que contenía aproximadamente 7000 UE/g de gelatina a una cantidad de agua purificada y se disolvió completamente (con la ayuda de un calentamiento a aproximadamente 60 °C para facilitar la disolución de la gelatina) para dar lugar a una solución de gelatina de pescado al 10% p/p. Después, la solución se enfrió a temperatura ambiente y se tomó una muestra de referencia para medir la conductividad. A continuación, se añadió una cantidad de cloruro de sodio ('NaCl') a la solución de gelatina, lo que dio lugar a una concentración de NaCl de 150 mM en la solución de gelatina-NaCl. Después se midió la conductividad de la solución de gelatina y NaCl.

[0069] Antes de la eliminación de la endotoxina, se preparó el dispositivo de intercambio aniónico (Sartobind Q Single Sep mini - filtro de 7 ml). La preparación previa al uso del dispositivo de intercambio aniónico y los tubos asociados se llevó a cabo según el procedimiento de pretratamiento. Se usó una solución de hidróxido de sodio ('NaOH') de 1 M para limpiar y desinfectar el sistema, a lo que siguió un lavado del sistema con una solución de NaCl de 1 M para eliminar la solución de NaOH. El adsorbedor se cebó con la solución de gelatina-NaCl para eliminar la solución de NaCl de 1 M utilizada para la preparación previa al uso. Después, utilizando una bomba peristáltica, se cargó la solución de gelatina-NaCl y se condujo a través del filtro Sartobind Q Single Sep mini de 7 ml. La bomba se configuró para mantener una presión constante para impulsar la solución a través del adsorbedor con una acumulación mínima de contrapresión. La solución de gelatina-NaCl filtrada se recogió en un recipiente limpio y se midió la conductividad de esta solución filtrada.

[0070] Se filtraron aproximadamente 435 g de la solución de gelatina-NaCl (en fracciones de 30 g) a través de un filtro Sartobind Q Single Sep mini de 7 ml. Se evaluó la capacidad de unión y el punto de ruptura del filtro en lo que respecta a la endotoxina recogiendo fracciones del filtrado a intervalos regulares y se evaluó el contenido de endotoxina y el contenido de gelatina del ensayo. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 2 y en la Figura 6.

TABLA 2

	Peso acumulado de la solución de gelatina filtrada (g)	Contenido de endotoxina (UE/g)	Contenido de gelatina del ensayo (% p/p)
5	Paso 101: preparación de la solución de gelatina		
	Solución de gelatina al 10%	0	No testado
10	Solución de gelatina al 10% con NaCl 150 mM	0	6440
			10,3; 10,3
	Paso 102: reducción de la endotoxina		
15	Cebado	30	N/A
	Fracción filtrada 1	60	<100
	Fracción filtrada 2	90	No testado
20	Fracción filtrada 3	120	112
	Fracción filtrada 4	150	No testado
	Fracción filtrada 5	180	122
	Fracción filtrada 6	210	No testado
25	Fracción filtrada 7	240	129
	Fracción filtrada 8	270	No testado
	Fracción filtrada 9	300	144
30	Fracción filtrada 10	330	No testado
	Fracción filtrada 11	360	138
	Fracción filtrada 12	390	No testado
35	Fracción filtrada 13	420	No testado
	Fracción filtrada 14	435	149
			10,6; 10,6

40 **[0071]** La Tabla 2 demuestra que la endotoxina presente en la gelatina se redujo mediante el dispositivo de filtrado Sartobind Q. Los datos también muestran una estabilización del nivel de endotoxina después de filtrarse 300 g de la solución (después de la fracción 9), de manera que el dispositivo finalmente se bloqueó en la fracción 14, cuando sólo se recogieron 15 ml debido al bloqueo del adsorbedor. Esto indica que se alcanzó una situación de equilibrio en el adsorbedor testado cuando habían pasado aproximadamente 300 g de la solución de sal de gelatina. En lugar de un avance de la endotoxina, la acumulación continua de la endotoxina en el dispositivo de filtrado finalmente provocó un bloqueo del dispositivo.

50 **[0072]** También se realizó un ensayo de espectroscopía UV con la muestra de solución de sal de gelatina prefiltrada y posfiltrada y este arrojó el mismo contenido de ensayo, confirmando que no se eliminó gelatina durante el proceso de filtración.

Ejemplo 2

55 **[0073]** Se añadió una cantidad de gelatina de pescado que contenía aproximadamente 14 600 UE/g de gelatina a una cantidad de agua purificada y se disolvió completamente (con la ayuda de un calentamiento a aproximadamente 60 °C para facilitar la disolución de la gelatina) para dar lugar a una solución de gelatina de pescado al 12% p/p. Después, la solución se enfrió a temperatura ambiente y se tomó una muestra de referencia para medir la conductividad. A continuación, se añadió una cantidad de cloruro de sodio ('NaCl') a la solución de gelatina, lo que dio lugar a una concentración de NaCl de 150 mM en la solución de gelatina-NaCl. Después se midió la conductividad de la solución de gelatina y NaCl.

65 **[0074]** Antes de la eliminación de la endotoxina, se preparó el dispositivo de intercambio aniónico (Sartobind Q 75 mL Capsule). La preparación previa al uso del dispositivo de intercambio aniónico y los tubos asociados se llevó a cabo según el procedimiento de pretratamiento. Se usó una solución de hidróxido de sodio ('NaOH') de 1 M para limpiar y desinfectar el sistema, a lo que siguió un lavado del sistema con una solución de NaCl de 1 M para eliminar la solución de NaOH. El adsorbedor se cebó con la solución de gelatina-NaCl para eliminar la solución de NaCl de 1 M utilizada

para la preparación previa al uso. Después, utilizando una bomba peristáltica, se cargó la solución de gelatina-NaCl y se condujo a través del Sartobind Q de 75 ml. La bomba se configuró para mantener una presión constante para impulsar la solución a través del adsorbedor con una acumulación mínima de contrapresión. La solución de gelatina-NaCl filtrada se recogió en un recipiente limpio y se midió la conductividad de esta solución filtrada.

[0075] Se filtraron aproximadamente 3000 g de la solución de gelatina-NaCl a través de un filtro Sartobind Q de 75 ml. Se evaluó la capacidad de unión y el punto de ruptura del filtro en lo que respecta a la endotoxina recogiendo fracciones del filtrado a intervalos regulares y se evaluó el contenido de endotoxina y el contenido de gelatina del ensayo. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 3 y en la Figura 7.

TABLA 3

	Peso acumulado de la solución de gelatina filtrada (g)	Conductividad (mScm)	Contenido de endotoxina (UE/g de gelatina)	Contenido de gelatina del ensayo (% p/p)
Paso 101: preparación de la solución de gelatina				
Solución de gelatina al 12%	0	(0,8-0,9)*	14 600	No testado
Solución de gelatina al 12% con NaCl 150 mM	0	No testado	13 600	12,4; 12,2
Paso 102: reducción de la endotoxina				
Cebado	224	-	-	-
<i>Filtrado antes de la fracción 1</i>	312	-	-	-
Fracción filtrada 1*	335	-	<100	12,1; 12,3
<i>Filtrado antes de la fracción 2</i>	588	-	-	-
Fracción filtrada 2*	611	-	No testado	No testado
<i>Filtrado antes de la fracción 3</i>	937	-	-	-
Fracción filtrada 3*	960	-	148	12,4; 12,6
<i>Filtrado antes de la fracción 4</i>	1230	-	-	-
Fracción filtrada 4*	1253	-	No testado	No testado
<i>Filtrado antes de la fracción 5</i>	1623	-	-	-
Fracción filtrada 5*	1648	-	188	12,2; 12,2
<i>Filtrado antes de la fracción 6</i>	1905	-	-	-
Fracción filtrada 6*	1927	-	No testado	No testado
<i>Filtrado antes de la fracción 7</i>	2184	-	-	-
Fracción filtrada 7*	2203	-	175	12,2; 12,3
<i>Filtrado antes de la fracción 8</i>	2419	-	-	-
Fracción filtrada 8*	2437	-	No testado	No testado
<i>Filtrado antes de la fracción 9</i>	2604	-	-	-
Fracción filtrada 9*	2617	-	158	12,3; 12,3
Fracción filtrada total recogida (Fracción 1-9)	188	-	-	-
Solución de gelatina filtrada total recogida (excluyendo las fracciones 1-9)	2429	13,4	119; <100	No testado

*Las fracciones de muestra recogidas fueron de aproximadamente 20 g cada una

[0076] La Tabla 3 demuestra que el Sartobind Q 75 ml tiene la capacidad de reducir el nivel de endotoxina de un lote de gelatina con un nivel de endotoxina inicial equivalente a 14 600 UE/g de gelatina a menos de 200 UE/g de gelatina. Así, se pueden filtrar aproximadamente 2,5 kg de una solución de sal de gelatina al 12 % p/p usando la cápsula de 75 ml, de manera que el nivel de endotoxina comienza a estabilizarse después de que se hayan filtrado aproximadamente 1,6 kg (después de la fracción 5) de la solución de sal de gelatina al 12% p/p, lo que indica que se ha alcanzado una situación de equilibrio. No se observó ningún punto de ruptura.

[0077] La parte de gelatina de la solución analizada no mostró cambios apreciables en cuanto a su contenido entre las soluciones de gelatina previas y posteriores a la filtración, lo que confirma que no se produjo una pérdida de gelatina en el adsorbedor de membrana de intercambio aniónico.

Ejemplo 3

[0078] Se añadió una cantidad de gelatina de pescado que contenía aproximadamente 14 600 UE/g de gelatina a una cantidad de agua purificada y se disolvió completamente (con la ayuda de un calentamiento a aproximadamente 60 °C para facilitar la disolución de la gelatina) para dar lugar a una solución de gelatina de pescado al 12% p/p. Después, la solución se enfrió a temperatura ambiente y se tomó una muestra de referencia para medir la conductividad. A continuación, se añadió una cantidad de cloruro de sodio ('NaCl') a la solución de gelatina, lo que dio lugar a una concentración de NaCl de 150 mM en la solución de gelatina-NaCl. Después se midió la conductividad de la solución de gelatina y NaCl.

[0079] Antes de la eliminación de la endotoxina, se preparó el dispositivo de intercambio aniónico (Sartobind Q 75 mL Capsule). La preparación previa al uso del dispositivo de intercambio aniónico y los tubos asociados se llevó a cabo según el procedimiento de pretratamiento. Se usó una solución de hidróxido de sodio ('NaOH') de 1 M para limpiar y desinfectar el sistema, a lo que siguió un lavado del sistema con una solución de NaCl de 1 M para eliminar la solución de NaOH. El adsorbedor se cebó con la solución de gelatina-NaCl para eliminar la solución de NaCl de 1 M utilizada para la preparación previa al uso. Después, utilizando una bomba peristáltica, se cargó la solución de gelatina-NaCl y se condujo a través del Sartobind Q de 75 ml. La bomba se configuró para mantener una presión constante para impulsar la solución a través del adsorbedor con una acumulación mínima de contrapresión. La solución de gelatina-NaCl filtrada se recogió en un recipiente limpio y se midió la conductividad de esta solución filtrada.

[0080] Se filtraron aproximadamente 5000 g de la solución de gelatina-NaCl a través de un filtro Sartobind Q de 75 ml. Se tomaron muestras de quince (15) de las fracciones filtradas, cada una de aproximadamente 20 g, para realizar pruebas. Entre las fracciones sucesivas, se filtraron aproximadamente 300 g de la solución de gelatina.

[0081] Los primeros 2000 g de la solución de sal de gelatina filtrada se transfirieron al sistema de diafiltración (Sartorius Sartoflow Advanced) para eliminar la sal mediante procesos de diafiltración y concentración. El sistema de diafiltración se configuró según las instrucciones operativas. Después se llevó a cabo la preparación previa al uso del sistema de diafiltración para limpiar y desinfectar el sistema según las instrucciones operativas. Se usó una solución de NaOH 1 M para limpiar y desinfectar el sistema y después se lavó el sistema con agua purificada para eliminar la solución de NaOH. Se aplicó un flujo de agua limpia previo al uso en el sistema de diafiltración para verificar que el filtro de flujo cruzado (casete) estaba limpio y funcionaba según los requerimientos. A esto le siguió una optimización de los parámetros de configuración (presión y tasa de flujo) antes del comienzo de la diafiltración.

[0082] La solución de sal de gelatina filtrada se cargó en el tanque del sistema de diafiltración. Se registró el peso de la solución que se cargó en el tanque y se midió la conductividad de la solución cargada usando una sonda de conductividad. La solución de sal de gelatina filtrada cargada se diluyó con agua purificada (de manera que la proporción de solución de sal de gelatina filtrada: agua era de 2:1 o 1:1 o 1:2 o 1:3 o 1:4 en función de la concentración de la gelatina). La mezcla se agitó para garantizar que estuviera bien mezclada.

[0083] Después se ajustó el sistema de diafiltración para obtener una diafiltración a un volumen constante. Una vez que el sistema se estabilizó, se inició la diafiltración para eliminar la sal. Se registró la conductividad de la solución al inicio de la diafiltración. Se monitorizó la conductividad y la mezcla se agitó constantemente durante todo el proceso de diafiltración. El proceso de diafiltración se detuvo cuando la conductividad alcanzó el mismo valor que la conductividad de la muestra de solución de gelatina de referencia.

[0084] Después, el sistema de diafiltración se configuró para concentrar la solución de gelatina desalada diluida eliminando el exceso de agua añadida para la dilución hasta que el peso de la solución de gelatina desalada fuera el mismo que el de la solución de sal de gelatina filtrada previa a la dilución. Al finalizar se limpió el sistema de diafiltración y después se aplicó un flujo de agua limpia posterior al uso para verificar que el filtro de flujo cruzado (casete) estaba limpio.

[0085] La filtración de la solución de sal de gelatina restante (unos 3000 g) continuó hasta el final. Se evaluó la capacidad de unión y el punto de ruptura del filtro en lo que respecta a la endotoxina recogiendo fracciones del filtrado a intervalos regulares y se evaluó el contenido de endotoxina y el contenido de la parte de gelatina sometida a la prueba. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 4 y en la Figura 8.

TABLA 4

	Peso acumulado de la solución de gelatina filtrada (g)	Conductividad (mScm)	Contenido de endotoxina (UE/g de gelatina)	Contenido de la gelatina testada (%)
Paso 101: preparación de la solución de gelatina				
Solución de gelatina al 12%	0	(~0,9)*	14 600	-
Solución de gelatina al 12% con NaCl 150 mM	0	13,2	14 000	12,4; 12,6
Paso 202: reducción de la endotoxina				
Cebado	(224)	-	N/A	N/A
<i>Filtrado antes de la fracción 1</i>	524	-	-	-
Fracción filtrada 1*	540		134	12,6; 12,6
<i>Filtrado antes de la fracción 2</i>	840	-	-	-
Fracción filtrada 2*	857	-	No testado	No testado
<i>Filtrado antes de la fracción 3</i>	1157	-	-	-
Fracción filtrada 3*	1177	-	269	No testado
<i>Filtrado antes de la fracción 4</i>	1476	-	-	-
Fracción filtrada 4*	1494		No testado	No testado
<i>Filtrado antes de la fracción 5</i>	1794	-	-	-
Fracción filtrada 5*	1810	-	697	12,4; 12,4
<i>Filtrado antes de la fracción 6</i>	2110	-	-	-
Fracción filtrada 6*	2127	-	No testado	No testado
*La solución de gelatina filtrada recogida se transfirió para la posterior diafiltración (~volumen acumulado de 2L)				
<i>Filtrado antes de la fracción 7</i>	2427	-	-	-
Fracción filtrada 7	2449	-	3780	No testado
<i>Filtrado antes de la fracción 8</i>	2748	-	-	-
Fracción filtrada 8	2771	-	No testado	No testado
<i>Filtrado antes de la fracción 9</i>	3071	-	-	-
Fracción filtrada 9	3092	-	No testado	12,3; 12,5
<i>Filtrado antes de la fracción 10</i>	3392	-	-	-
Fracción filtrada 10	3412	-	No testado	No testado
<i>Filtrado antes de la fracción 11</i>	3712	-		
Fracción filtrada 11	3732	-	3480	No testado

(continuación)

	Peso acumulado de la solución de gelatina filtrada (g)	Conductividad (mScm)	Contenido de endotoxina (UE/g de gelatina)	Contenido de la gelatina testada (%)
5	<i>Filtrado antes de la fracción 12</i>	4032		
	Fracción filtrada 12	4051	No testado	No testado
10	<i>Filtrado antes de la fracción 13</i>	4351		
	Fracción filtrada 13	4366	2160	12,9; 12,4
	<i>Filtrado antes de la fracción 14</i>	4666		
15	Fracción filtrada 14	4690	No testado	No testado
	<i>Filtrado antes de la fracción 15</i>	4990		
	Fracción filtrada 15	5002	1010	12,3; 12,4
20	Paso 103: eliminación de NaCl			
	*Gelatina filtrada recogida / Pre Diafiltración	N/A	-	No testado
	*Solución de gelatina filtrada recogida / Post Diafiltración	N/A	1,2	405

*Conductividad determinada como muestra de referencia separada

[0086] La Tabla 4 demuestra que Sartobind Q 75 ml tiene la capacidad de reducir el nivel de endotoxina de un lote de gelatina con un nivel de endotoxina equivalente a 14 600 UE/gramo de gelatina a menos de 1000 UE/gramo de gelatina durante aproximadamente los primeros 2 kg de una solución de sal de gelatina al 12% p/p. El nivel de endotoxina se mantuvo cuando este material se procesó a través del sistema de diafiltración. Durante los siguientes 3 kg de la solución de sal de gelatina que se filtraron, el nivel de endotoxina continuó aumentando seguido de una disminución. Esto indica un avance de la endotoxina después de filtrar un volumen de 2 kilogramos con el Sartobind Q 75 ml.

[0087] En lo que respecta al contenido de gelatina, las muestras con la endotoxina reducida filtradas no mostraron una diferencia sustancial en cuanto a la gelatina en comparación con las muestras previas a la filtración. Esto confirmó (como en los ejemplos anteriores) que la gelatina no se unía a la membrana del adsorbedor de intercambio aniónico durante la filtración. En el caso de la muestra posterior a la diafiltración, la muestra presentó un contenido de gelatina comparable. Además, las mediciones de conductividad de la muestra desalada mostraron un valor de conductividad comparable al de la muestra previa a la adición de sal, lo que confirma que el proceso de desalación fue un éxito.

Ejemplo 4

[0088] Para el ejemplo 4, se fabricó un lote de pastillas liofilizadas con una solución acuosa de gelatina de pescado baja en endotoxinas usando los tres pasos descritos en las Figuras 2, 3 y 5. El agua purificada utilizada en el ejemplo 4 tenía un nivel de endotoxinas inferior a 0,1 EU/ml.

[0089] Se preparó una solución acuosa de gelatina de pescado y cloruro de sodio de 3 kg que contenía un 9% p/p de gelatina de pescado y NaCl 150 mM tal y como se describe en la Figura 2 y los párrafos relacionados. La gelatina de pescado se añadió al agua purificada y se disolvió completamente (con ayuda de un calentamiento a aproximadamente 60 °C) para dar lugar a una solución de gelatina de pescado. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se añadió NaCl a la solución de gelatina de pescado. Se midió el nivel de endotoxina de la solución de sal de gelatina resultante y se comprobó que era de 1100 UE/g.

[0090] Para reducir la endotoxina presente en la solución de sal de gelatina, la solución se filtró a través del dispositivo de intercambio aniónico (Sartobind Q con cápsula de 75 ml) tal y como se ha descrito en referencia a la Figura 3 y en los párrafos relacionados. Antes de la filtración, la cápsula de Sartobind Q y los tubos asociados se limpiaron y se desinfectaron mediante bombeo con una solución de hidróxido de sodio 1 M a través del sistema usando una bomba peristáltica. A esto le siguió el bombeo de agua purificada a través del sistema para eliminar la solución de hidróxido de sodio. Después, el sistema se cebó bombeando una solución de NaCl 1 M a través del sistema, seguida de una porción de la solución de sal de gelatina para eliminar la solución de NaCl. Esta porción de la solución de sal de gelatina se desechó.

[0091] La porción restante de la solución de sal de gelatina se filtró a través del filtro Sartobind Q para reducir su contenido de endotoxina. La solución de sal de gelatina filtrada recogida fue de aproximadamente 2,3 kg. La solución de

sal de gelatina filtrada se transfirió después a un sistema de diafiltración (Sartorius Sartoflow Advanced) para eliminar la sal mediante los procesos de diafiltración y concentración descritos en la Figura 5 y los párrafos relacionados.

[0092] Antes de iniciar el proceso de desalación/concentración, el sistema de diafiltración se limpió y se desinfectó usando una solución de NaOH 1 M seguida de un lavado con agua purificada. También se aplicó al sistema un flujo de agua limpia previo al uso. Después, el sistema se configuró para que tuviera una presión y una tasa de flujo óptimos utilizando un filtro de flujo cruzado (casete) de 10 kDa.

[0093] Después, el sistema de diafiltración se ajustó para una diafiltración a un volumen constante. Se monitorizó la conductividad de la solución, y el proceso de diafiltración se detuvo cuando la conductividad alcanzó el valor objetivo, que en este ejemplo era inferior a 0,5 mScm-1. Después, el sistema de diafiltración se ajustó para concentrar la solución de gelatina desalada filtrada hasta obtener una concentración de gelatina objetivo del 12% p/p (rango de 10-14%). Al finalizar, se midió el contenido de gelatina y endotoxina de la solución de gelatina resultante (filtrada-desalada/concentrada). La solución resultante tenía un contenido de gelatina de un 11% p/p y un nivel de endotoxina de 83 UE/g. Se recogieron aproximadamente 1,8 kg de la solución de gelatina resultante.

[0094] La siguiente Tabla 5 resume la fabricación de pastillas liofilizadas con la gelatina baja en endotoxinas del Ejemplo 5.

TABLA 5

Ingrediente	% p/p	Cantidad en mg para una alícuota de 500 mg para dosificación	Cantidad en mg tras la liofilización
Solución tampón (para simular la formulación de una vacuna líquida)	25%	125mg	~2,6 mg**
Gelatina de pescado baja en endotoxinas (en una solución objetivo de gelatina de pescado al 12% p/p)	50%	250 mg (contiene 30 mg de gelatina de pescado)	30 mg**
Manitol	8%	40 mg	40 mg
Trehalosa	0,75%	3,75 mg	3,74 mg
Modificador del pH	Rango de pH 6.5-7.8 (qs)	~1,3 mg	~0,04 mg**
Agua (para preparar la mezcla de matriz acuosa)	100% (qs)	~73,5 mg	Agua eliminada

**después de eliminar el agua durante la liofilización

[0095] En este ejemplo, se preparó una mezcla para una formulación de vacuna simulada de 1 kg para la fabricación de pastillas liofilizadas. La mezcla de formulación contenía un 50% p/p de la solución de gelatina de pescado filtrada baja en endotoxinas (es decir, en la fabricación se usaron 0,5 kg de la solución de gelatina de pescado filtrada preparada anteriormente). La formulación se preparó añadiendo y disolviendo el manitol y la trehalosa en la solución de gelatina de pescado filtrada a una temperatura de entre 13 y 17°C. El pH se ajustó hasta un pH objetivo de 7.4 usando un modificador de pH (por ejemplo, una solución de NaOH al 3%). Después se añadió la formulación de vacuna líquida simulada (en este caso, una solución tampón) y se comprobó que el pH todavía estaba dentro del rango de pH establecido. A continuación se añadió agua para completar el lote.

[0096] La formulación se añadió en dosis según el peso (dosis húmeda) a los compartimentos de blíster preformados. En este caso, se añadió una alícuota de 500 mg a cada compartimento de blíster preformado. Una vez con sus dosis, los blísteres se pasaron a través de un túnel de congelación de nitrógeno líquido en el que el agua de la mezcla se congeló dentro de los compartimentos del blíster. Tras salir del túnel de congelación, el producto se almacenó congelado en armarios refrigerados antes de su liofilización. Se aplicó a las pastillas congeladas el tiempo de mantenimiento de congelación requerido (también denominado 'tiempo de consolidación') para consolidar las pastillas. En este caso se usó un tiempo de mantenimiento de congelación de 6 horas. Después, las pastillas congeladas se cargaron en los estantes de un liofilizador, donde se eliminaron los cristales de hielo de las pastillas congeladas mediante sublimación a baja presión. Las pastillas liofilizadas resultantes presentaban una porosidad muy alta que permitía una rápida desintegración. Esto se determina mediante una prueba interna de tiempo de dispersión (tiempos de humectación y disociación). Se analizaron las muestras de cinco pastillas liofilizadas resultantes y se descubrió que normalmente duraban menos de 10 segundos. Los resultados se resumen en la Tabla 6. En algunas realizaciones, también se considera aceptable un tiempo de dispersión de hasta 60 segundos para el producto cuando se requiere un

perfil más lento de dispersión/desintegración de la pastilla. También se evaluó el contenido de endotoxina de las pastillas liofilizadas resultantes. Se descubrió que este era en promedio de menos de 75 UE por pastilla.

TABLA 6

Tiempo de humectación de la pastilla		Tiempo de disociación de la pastilla	
Rango (n=5) Segundos	Tiempo promedio (n=5) Segundos	Rango (n=5) Segundos	Tiempo promedio (n=5) Segundos
< 2 - < 4	< 3	< 5 - < 7	< 6

Métodos de medición

[0097] Medición de la conductividad: La conductividad de una solución se mide usando un conductímetro. El conductímetro mide la cantidad de iones o partículas cargadas presentes en la solución. Los iones responsables de la conductividad provienen de electrolitos disueltos en agua. Las sales (como el cloruro de sodio), los ácidos y las bases son todos ellos electrolitos. El valor de la conductividad es proporcional a la concentración de los electrolitos. La sonda de conductividad se calibra usando una solución de calibración de conductividad. Después se mide la conductividad de las soluciones. En la presente divulgación, en el paso 101 se añade sal a la solución de gelatina y, posteriormente, en el paso 103 se elimina mediante el proceso de desalación. Para completar el proceso de desalación, la conductividad de la solución de gelatina desalada debe ser comparable a la solución de gelatina original (previa a la adición de sal). La gelatina tiene algunos iones residuales, por lo que se mide la conductividad de la solución de gelatina (sin sal) para establecer la conductividad de referencia. Este valor de conductividad se usa después para configurar el sistema de diafiltración. La diafiltración de la solución progresa hasta que la conductividad alcanza este valor de referencia. Una vez alcanzado este valor, da comienzo el proceso de concentración y la conductividad se mantiene.

[0098] Medición del contenido de endotoxina: El contenido de endotoxina de una solución se determina de acuerdo con el Método de la Farmacopea 'EP2.6.14/USP<8> Bacterial Endotoxins - Method D Chromogenic Kinetic'. La prueba de endotoxinas bacterianas (BET) se utiliza para detectar o cuantificar las endotoxinas de bacterias gramnegativas usando el lisado de amebocitos del cangrejo herradura ('Limulus polyphemus' o 'Tachypleus tridentatus'). La técnica utilizada para esta prueba es la técnica cromogénica, basada en el desarrollo de color después de la escisión de un complejo péptido-cromógeno sintético. En la práctica, se prepara una muestra del producto para obtener una concentración de muestra de 10 mg/ml y, utilizando una dilución predeterminada (1:1000), se analiza el contenido de endotoxina(s) usando una curva estándar con fines comparativos.

[0099] Medición del contenido de la gelatina analizada: Se usó análisis de espectroscopía UV para determinar el contenido de gelatina de las soluciones desveladas en el presente documento. Se estableció una curva de calibración del contenido de gelatina midiendo la absorbancia UV de las muestras de calibración (rango de concentración de entre 0,006 y 0,26 mg/ml) a una longitud de onda de 220 nm. Para las muestras de prueba, se pesaron las cantidades adecuadas en un matraz volumétrico de 100 ml y se completó el volumen con agua desionizada de modo que la concentración teórica de estas soluciones fuese de aproximadamente 0,05 mg/ml. Se midió la absorbancia UV de las muestras a 220 nm, a partir de lo cual se determinó la concentración real de gelatina en mg/ml. Basándose en este valor, se calculó el porcentaje (%) de contenido de gelatina en las muestras de prueba.

[0100] Medición de la concentración de sal: La concentración de sal se puede determinar mediante la conductividad (es decir, usando un conductímetro). Se puede obtener un gráfico de calibración midiendo la conductividad de una solución salina para un rango de concentraciones salinas. La gelatina puede tener algunos electrolitos residuales; por lo tanto, la concentración inicial puede ser de ~ 0,8-1 mScm, por ejemplo. Cuando se añade sal a la solución de gelatina, se puede medir la conductividad (que se atribuirá a los electrolitos residuales + la sal añadida. Por ejemplo, ~ 13 mScm). La eliminación de la sal añadida se puede controlar durante la diafiltración hasta que alcance nuevamente el valor inicial. En este punto, se puede suponer que se ha eliminado toda la sal añadida.

[0101] La concentración de sal o la conductividad pueden medirse cuando se prepara la solución de gelatina; después de haber añadido la sal a la solución de gelatina para formar la solución de sal de gelatina; y durante todo el proceso de diafiltración.

[0102] Medición de las características de dispersión (prueba 'in vitro'): Características de dispersión (prueba 'in vitro'): Se analizan un mínimo de 5 pastillas. Primero se prepara un vaso de precipitados que contiene aproximadamente 200 ml de agua purificada a 20°C ± 0,5°C. Después se retira cada pastilla del blister y se coloca la pastilla con la base hacia abajo sobre la superficie del agua. Se registra el tiempo que tarda cada pastilla en humedecerse o disociarse por completo. La humectación es el tiempo que tarda una unidad en humedecerse por completo. La humectación de la pastilla puede producirse en pequeñas zonas, de manera que finalmente se fusionan cuando toda la unidad está humedecida. La prueba de dispersión se considera completa cuando el centro de la unidad es una masa humedecida. Por consiguiente, el tiempo de humectación se toma desde que el centro de la unidad se ha humedecido de lado a lado,

ya que esta es la parte más gruesa de la unidad. Se registra el tiempo de humectación para cada una de las cinco pastillas. El tiempo máximo para cada prueba es de 60 segundos. Un tiempo mayor que este puede anotarse simplemente como "mayor que 60 segundos". Disociación = el tiempo que tarda la unidad en separarse. Este tiempo se puede tomar cuando la unidad comienza a desmoronarse por los bordes. Se registra el tiempo de disociación para cada una de las cinco pastillas. El tiempo máximo para cada prueba es de 60 segundos. Los tiempos más largos que este pueden anotarse como "mayor que 60 segundos". A veces, la unidad no se humedecerá ni se disociará completamente dentro de este límite de tiempo. A veces, la unidad puede tener bultos duros; otras veces, es posible que la superficie no se haya mojado en absoluto. Además, toda la unidad puede estar cubierta por una piel dura. Si esto sucede, se anota en la descripción, haciendo mención a los 'bultos duros' o 'restos de piel', según corresponda. La formación de 'bultos duros' y/o 'piel' puede indicar un colapso microestructural durante la liofilización. Las Figuras 9A-C muestran una representación simplificada de los tres posibles estados no dispersos, con una vista lateral y una vista superior de las unidades tal y como se verían en el agua. Las fotografías de las Figuras 9A-C muestran algunas unidades representativas de las mismas categorías. El criterio principal para la prueba de características de dispersión es si las 5 pastillas pueden humedecerse completamente y/o disociarse en una masa palpable sin la presencia de bultos duros ni piel en 60 segundos o menos. En algunas realizaciones, las formas de dosificación desveladas en el presente documento pueden humedecerse completamente y/o disociarse en una masa palpable sin la presencia de bultos duros y/o piel en 60 segundos o menos.

Definiciones

[0103] A menos que se especifique lo contrario, todos los términos relacionados con la técnica, las anotaciones y otros términos o terminología técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente una persona con habilidades comunes en la técnica a la que pertenece el contenido reivindicado. En algunos casos, los términos con un significado comúnmente entendido se definen en el presente documento para mayor claridad y/o para facilitar las referencias, pero no debe interpretarse necesariamente que la inclusión de dichas definiciones en el presente documento represente una diferencia sustancial con respecto a lo que se entiende generalmente en la técnica pertinente.

[0104] En el presente documento, la referencia a 'aproximadamente' un valor o parámetro incluye (y describe) las variaciones que están relacionadas con dicho valor o parámetro 'per se'. Por ejemplo, una descripción que hace referencia a 'aproximadamente X' incluye la descripción de 'X'. Además, la referencia a las frases 'menor que', 'mayor que', 'como máximo', 'al menos', 'menor o igual que', 'mayor o igual que' u otras frases similares seguidas de una serie de valores o parámetros pretende aplicar la frase a cada valor o parámetro de la serie de valores o parámetros. Por ejemplo, cuando se afirma que una solución tiene una concentración de al menos aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM o aproximadamente 20 mM, esto significa que la solución tiene una concentración de al menos aproximadamente 10 mM, al menos aproximadamente 15 mM o al menos aproximadamente 20 mM.

[0105] Tal y como se utilizan en el presente documento, las formas singulares 'un', 'una', 'el' y 'la' incluyen también sus formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. También debe entenderse que el término 'y/o', tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a y abarca cualquiera y todas las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados. Asimismo, debe entenderse que, cuando se utilizan en el presente documento, los términos 'incluye(n)', 'que incluye(n)', 'comprende(n)' y/o 'que comprende(n)' especifican la presencia de las características, números enteros, pasos, operaciones, elementos, componentes y/o unidades indicados, pero no excluyen la presencia o adición de otras características, números enteros, pasos, operaciones, elementos, componentes, unidades y/o grupos de los mismos.

[0106] La presente solicitud desvela diversos rangos numéricos en el texto y las figuras. Los rangos numéricos desvelados admiten intrínsecamente cualquier rango o valor dentro de los rangos numéricos desvelados, incluidos los extremos, incluso aunque en la especificación no se establezca textualmente una limitación precisa de los rangos, ya que la presente divulgación puede ponerse en práctica en todos los rangos numéricos desvelados.

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir la endotoxina presente en la gelatina, que comprende:
5 disolver una sal en una solución de gelatina que comprende gelatina y un solvente para formar una solución de gelatina y sal, de manera que el contenido de endotoxina de la gelatina es de al menos 6000 UE/g y de manera que la concentración de sal en la solución de gelatina y sal es de 125-300 mM;
10 filtrar la solución de gelatina y sal a través de un adsorbedor de intercambio aniónico, de tal manera que la solución de gelatina y sal filtrada tiene un contenido de endotoxina inferior a 2500 UE/g; y
15 desalar la solución de gelatina y sal filtrada para formar una solución de gelatina baja en endotoxinas que tiene un contenido de endotoxina inferior a 2500 UE/g.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la concentración de sal de la solución de gelatina y sal es de aproximadamente 145-155 mM.
- 15 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la solución de gelatina es una solución de gelatina al 1-20% p/p.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que disolver la sal en la solución de gelatina comprende calentar la solución de gelatina a 50-70°C.
- 20 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el contenido de endotoxina de la solución de gelatina y sal y de la solución de gelatina baja en endotoxinas es inferior a 1000 UE/g.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que filtrar la solución de gelatina y sal a través de un adsorbedor de intercambio aniónico reduce el contenido de endotoxina de la solución en al menos un 95%.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que al menos aproximadamente el 85% del contenido de gelatina se recupera en la solución de gelatina y sal filtrada después de filtrar la solución de gelatina y sal a través de un adsorbedor de intercambio aniónico.
- 30 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la desalación de la solución de gelatina y sal filtrada se logra mediante un proceso de diafiltración, en el que el proceso de diafiltración comprende diluir la solución de gelatina y sal filtrada con un segundo solvente y filtrar la solución de gelatina y sal filtrada diluida para formar una solución de gelatina filtrada diluida.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, en el que la solución de gelatina y sal filtrada diluida se filtra hasta que la conductividad de la solución de gelatina filtrada diluida esté a menos de un 25% de la conductividad de la solución de gelatina.
- 40 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en el que la relación entre la solución de gelatina y sal filtrada y el segundo solvente es de 1:1 a 1:4.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que el segundo solvente se elimina de la solución de gelatina filtrada diluida para formar la solución de gelatina baja en endotoxinas, y en el que opcionalmente el segundo solvente se elimina de la solución de gelatina filtrada diluida hasta que el peso de la solución de gelatina filtrada diluida esté a menos de un 5% del peso de la solución de gelatina y sal filtrada.
- 45 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que además comprende eliminar el solvente de la solución de gelatina baja en endotoxinas para formar una gelatina baja en endotoxinas que tiene un contenido de endotoxina inferior a 2500 UE/g.
- 50 13. Una forma de dosificación para administrar un ingrediente farmacéuticamente activo preparada mediante un método que comprende: añadir una dosis de una formulación (que comprende la solución de gelatina baja en endotoxinas preparada mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12) a un molde preformado; y liofilizar la solución de gelatina baja en endotoxinas para obtener la forma de dosificación.
- 55

100

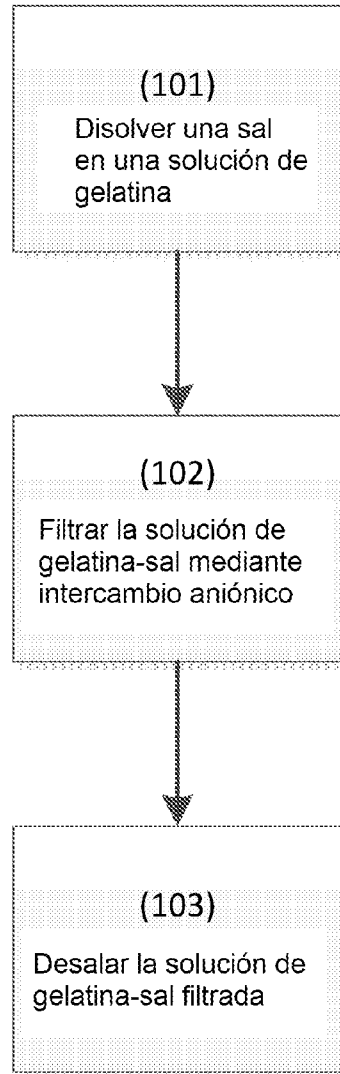


FIGURA 1

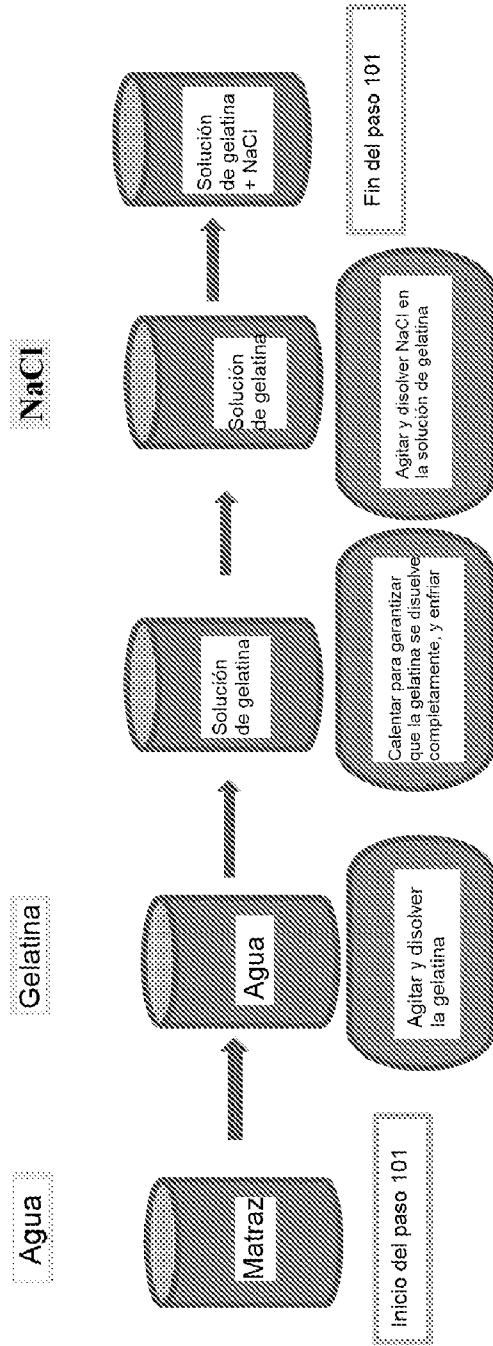


FIGURA 2

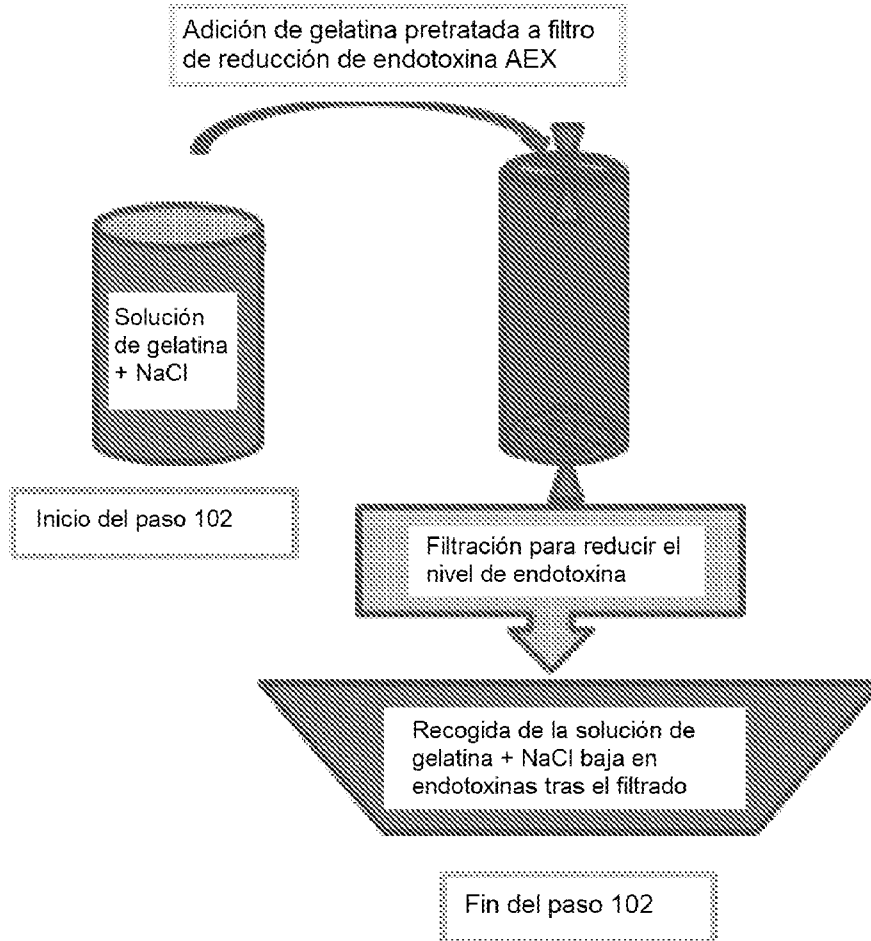


FIGURA 3

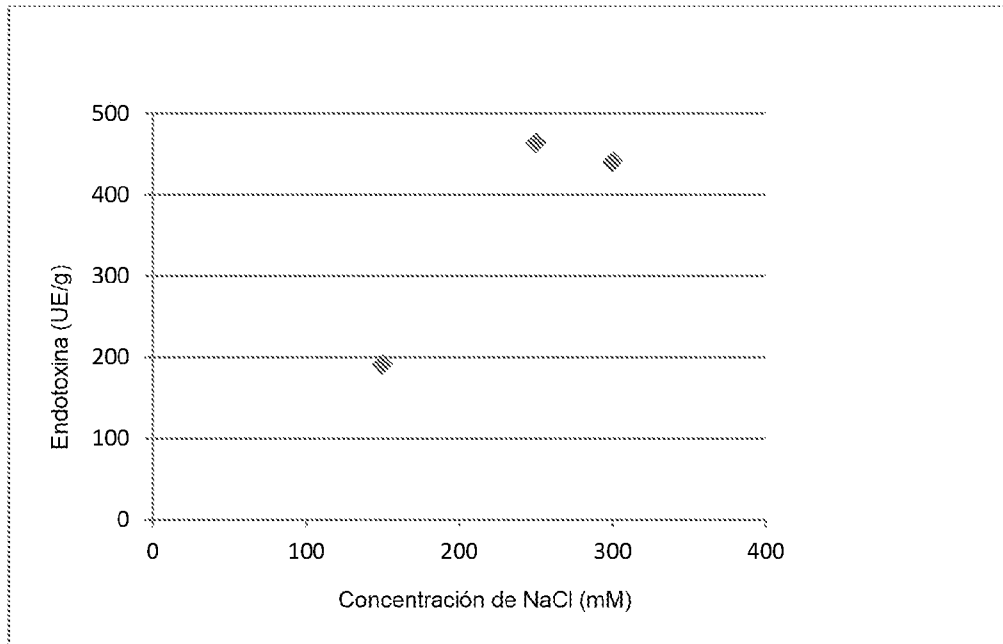


FIGURA 4

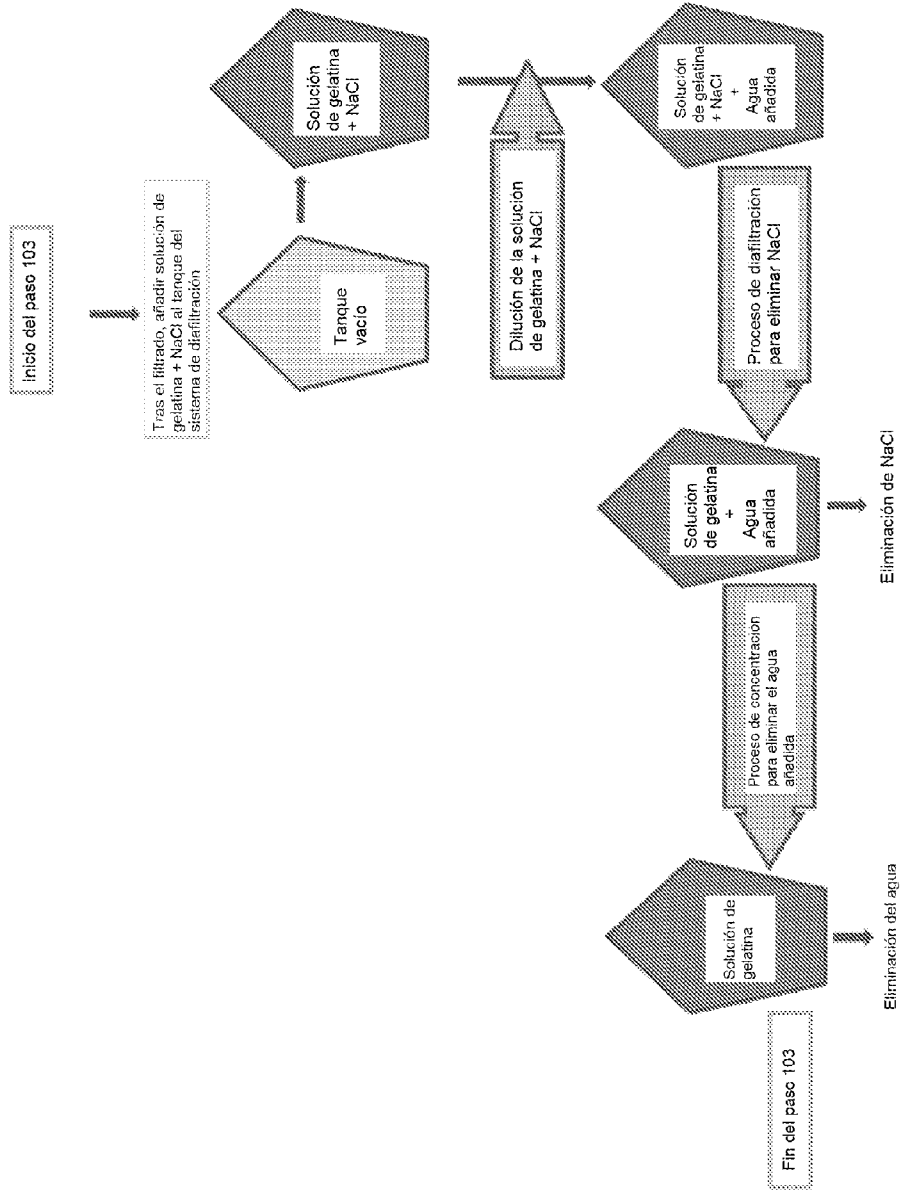


FIGURA 5

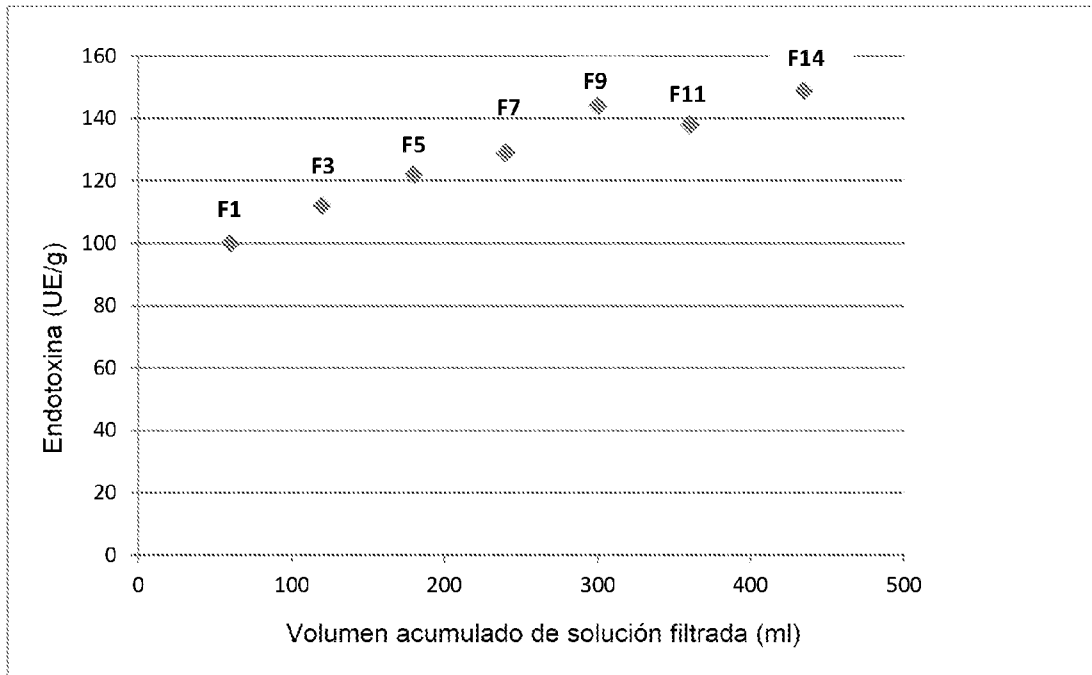


FIGURA 6

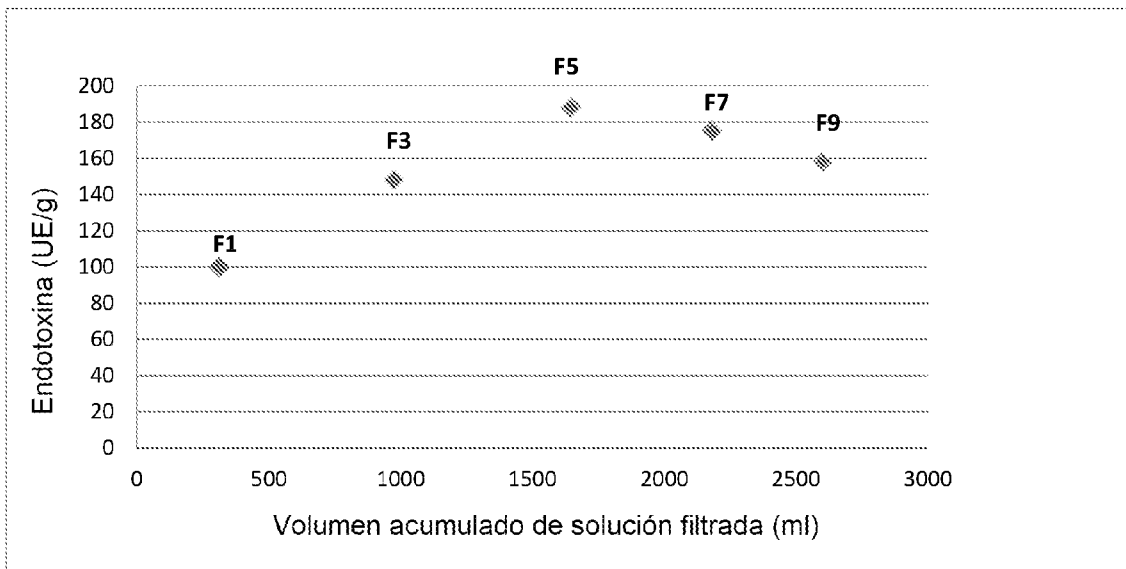


FIGURA 7

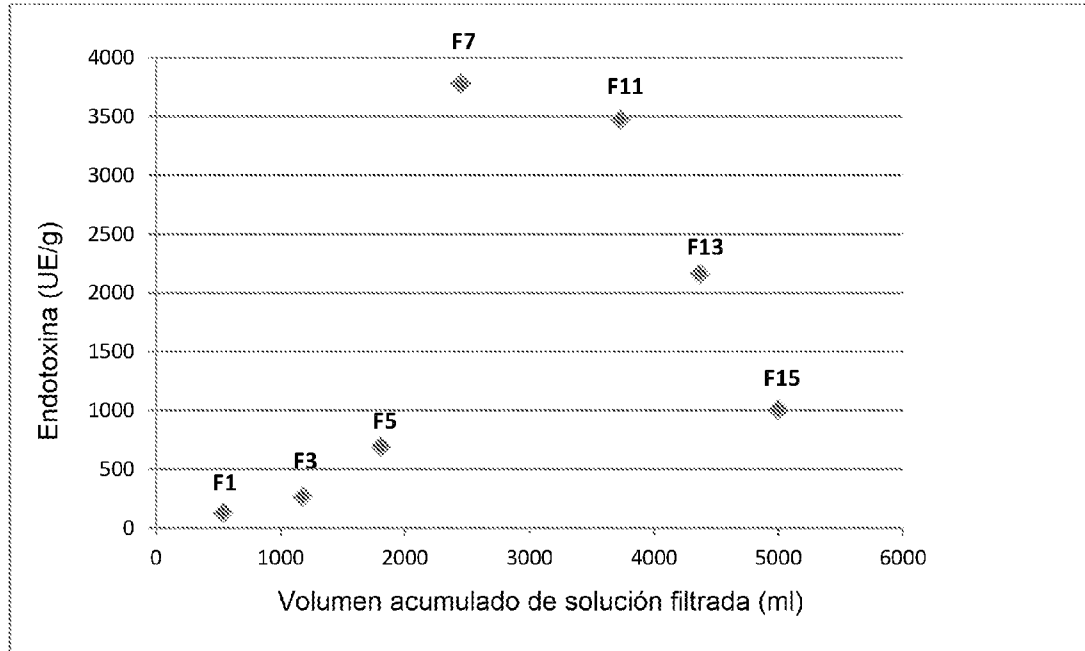
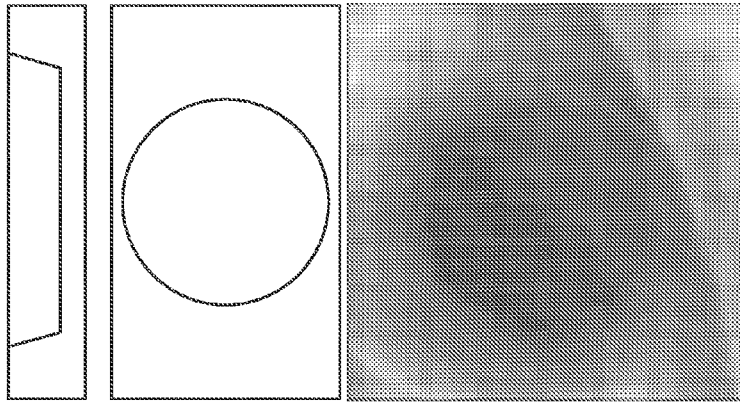
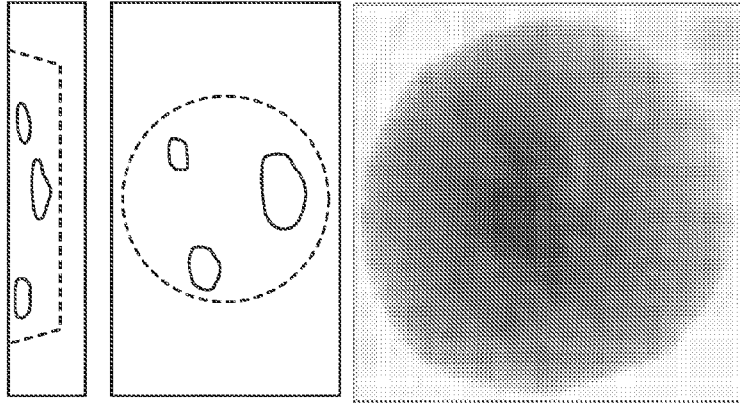


FIGURA 8



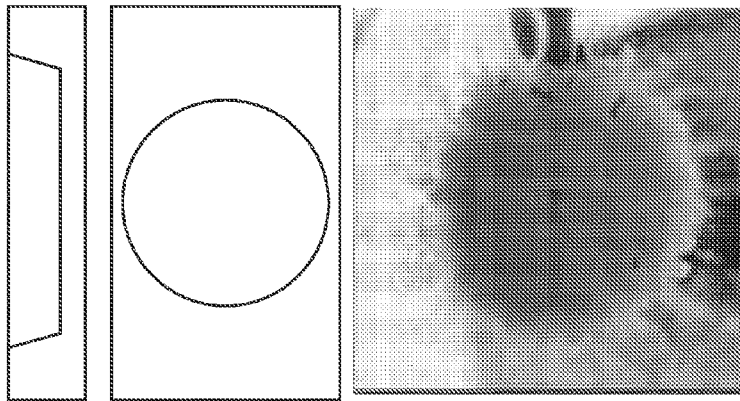
RESTOS DE PIEL

FIG. 9C



GRUMOS

FIG. 9B



COMPLETAMENTE HUMEDECIDO

FIG. 9A