

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 828 498**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2013** **PCT/IL2013/000088**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014** **WO14087394**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2013** **E 13820993 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2020** **EP 2925347**

54 Título: **Solución de trombina y método de uso de la misma**

30 Prioridad:

03.12.2012 IL 22339612

17.01.2013 US 201361753542 P

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

26.05.2021

73 Titular/es:

OMRIX BIOPHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)

Bldg. 14 Weizmann Science Park P.O. Box 619

Rehovot 76106, IL

72 Inventor/es:

MEIDLER, ROBERTO;

BELYAEV, OLEG;

BAR, LILIANA y

NUR, ISRAEL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 828 498 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

Solución de trombina y método de uso de la misma

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere al campo de las soluciones farmacéuticas, y más específicamente a métodos para la liofilización de una solución acuosa de trombina, soluciones de trombina para su uso en tales métodos de liofilización, y composiciones de trombina sólidas producidas por tales métodos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La trombina es una enzima proteolítica formada a partir del plasma de protrombinina durante el proceso de coagulación.

La trombina se usa ampliamente en aplicaciones clínicas como factor de coagulación para detener el sangrado de heridas mediante la conversión de fibrinógeno en fibrina. Es un componente común de los apósitos quirúrgicos y se ha usado en combinación con fibrinógeno y otras proteínas de coagulación en sistemas hemostáticos de dos componentes como pegamentos de fibrina, adhesivos y selladores.

Se conoce liofilizar una solución de trombina para producir una composición de trombina sólida antes del almacenamiento, para reducir la degradación de proteínas, en donde la composición de trombina sólida puede reconstituirse antes de su uso. La liofilización se refiere típicamente al proceso de congelar una mezcla y luego reducir la concentración de agua, por ejemplo, por sublimación a niveles que no soportan reacciones biológicas o químicas. El material sólido poroso y esponjoso resultante del proceso de liofilización se denomina torta. Es deseable que tales composiciones sólidas de trombina tengan un bajo contenido de agua (por ejemplo, menos de aproximadamente el 3%), para retener la estabilidad estructural y funcional durante periodos prolongados, preferiblemente a temperatura ambiente, y para retener un alto porcentaje de actividad de trombina tras la reconstitución en comparación con la actividad de trombina en la solución antes de la liofilización.

Ejemplos de soluciones de trombina del estado de la técnica se describen en la EP 813598B1; 5.605.884; US 4.877.608; US 2010/0074865; US 5.733.873; EP 1766003; y US 2010/0168018. Las soluciones de trombina del estado de la técnica varían considerablemente en el número y tipos de excipientes presentes y en las concentraciones de los excipientes individuales.

Los crioprotectores o estabilizadores se usan comúnmente en soluciones de trombina para proteger la trombina de la desnaturalización o pérdida de actividad debido al estrés por congelación, para estabilizar la proteína en los pasos de producción posteriores y para extender la vida útil. Los ejemplos de crioprotectores incluyen sacáridos como sacarosa, lactosa y trehalosa; alcoholes de azúcar como manitol; y surfactantes como polietilenglicol, TritonX-100, TWEEN-20 y TWEEN-80. Además de funcionar como estabilizadores, el manitol y la sacarosa (en menor grado) también se usan como agentes de carga que ayudan a proporcionar una torta que tiene una fuerte estructura física. El uso de agentes de carga es especialmente importante para formulaciones con un bajo contenido de material sólido (por volumen).

La albúmina de suero humano (HSA) también se usa ampliamente en formulaciones biofarmacéuticas como agente estabilizador y de carga (H.R. Constantino, M.J. Pikal: Lyophilization of Biopharmaceuticals, Springer, 2004).

La EP 813598B1 divulga una formulación de trombina simple para liofilización, que contiene ácido glucónico 40 mM, citrato trisódico 20 mM y NaCl 150 mM; la US 5.605.884 y la US 4.877.608 divulgan formulaciones que contienen hasta un 10% de sacáridos como sacarosa, manitol o maltosa; la US 2010/0074865 divulga una formulación que contiene un 5,7% de lactosa, un 3,1% de trehalosa y un 0,001% de TWEEN-80; y la US 5.733.873 divulga formulaciones que incluyen un 0,001-0,025% de polisorbato 80 (TWEEN-80) con o sin un 0,1% de PEG 4000 y un 2% de manitol.

El cloruro de sodio (NaCl) se usa comúnmente para reducir la precipitación y agregación de proteínas durante la liofilización de formulaciones biofarmacéuticas. Sin embargo, la EP 1766003 divulga que el NaCl puede ser problemático ya que reduce la temperatura de transición vítrea, por lo que necesita una temperatura baja de secado primario y un tiempo de ciclo de secado prolongado. También, la US 2010/0168018 divulga una formulación sin NaCl, o con NaCl presente en cantidades traza.

La US 2011/045034 A1 analiza una esponja de gelatina reticulada seca mejorada que comprende una capa de un ingrediente activo, los métodos de su preparación y usos de la misma.

Los métodos de liofilización de tales soluciones de trombina conocidas son frecuentemente de una duración

muy larga, lo que aumenta el costo del proceso y/o da como resultado composiciones de trombina sólidas que tienen un contenido de agua relativamente alto y/o que retienen un porcentaje relativamente bajo de actividad de trombina tras la reconstitución, en comparación con la actividad de la trombina en la solución antes de la liofilización.

5 SUMARIO DE LA INVENCION

La invención, en algunas de sus realizaciones, se refiere a métodos para la liofilización de una solución acuosa de trombina, soluciones de trombina para su uso en tales métodos de liofilización, y composiciones de trombina sólidas producidas mediante tales métodos, como se define en las reivindicaciones adjuntas. En algunas realizaciones, las soluciones y métodos divulgados en la presente permiten preparar composiciones de trombina sólidas usando métodos de liofilización que son más cortos que los métodos conocidos para la liofilización de soluciones de trombina, por ejemplo, un 37% más cortos, aumentando de este modo la capacidad de liofilización y la rentabilidad.

En algunas realizaciones, los métodos de liofilización descritos en la presente dan como resultado composiciones de trombina sólidas que tienen un contenido de agua relativamente bajo y/o que son altamente estables a temperatura ambiente durante períodos de tiempo relativamente largos, y/o que muestran una alta recuperación de la actividad de trombina tras la reconstitución. En algunas realizaciones, el método comprende el uso de una formulación de trombina acuosa óptima.

Los aspectos y realizaciones de la invención se describen en la memoria descriptiva a continuación y en las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones descritas en la presente, se proporciona un método para la liofilización de una solución acuosa de trombina, el método comprendiendo proporcionar la solución acuosa de trombina que comprende aproximadamente el 1 a menos de aproximadamente el 4,6% (p/v) de sacárido o alcohol de azúcar; por lo menos aproximadamente el 0,7 a menos de aproximadamente el 1,75% (p/v) de cloruro de sodio; de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 3% de albúmina; cloruro de calcio; y acetato de sodio; y liofilizar la solución acuosa de trombina, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presencia de calcio en la solución acuosa de trombina estabiliza la estructura de la trombina conservando de este modo su actividad durante la liofilización. Además, se requiere calcio para mantener la actividad hemostática de la trombina. Después de la liofilización de una solución acuosa de trombina, se obtiene un material sólido poroso y esponjoso, denominado torta (también denominado en la presente composición sólida de trombina).

En algunas realizaciones, la solución acuosa de trombina comprende de aproximadamente 200 a aproximadamente 2000 UI/ml de trombina; de aproximadamente un 0,3 a aproximadamente un 1,5% (p/v) de cloruro de calcio; y de aproximadamente un 0,14 a aproximadamente un 1% (p/v) de acetato de sodio.

En algunas realizaciones, la solución acuosa de trombina comprende de aproximadamente el 1,6 a menos de aproximadamente el 4,6% (p/v) de sacárido o alcohol de azúcar; de aproximadamente el 0,7 a aproximadamente el 1,7% (p/v) de cloruro de sodio; más de aproximadamente el 0,2 a menos de aproximadamente el 3% de albúmina; de aproximadamente el 0,3 a aproximadamente el 1,2% (p/v) de cloruro de calcio; y de aproximadamente el 0,14 a aproximadamente el 0,7% (p/v) de acetato de sodio.

En algunas realizaciones, el sacárido o alcohol de azúcar está presente en una concentración del 2% (p/v); la albúmina está presente en una concentración de aproximadamente el 0,6% (p/v); el cloruro de sodio está presente en una concentración de aproximadamente el 0,76% (p/v); el cloruro de calcio está presente en una concentración de aproximadamente el 0,6% (p/v) y el acetato de sodio está presente en una concentración de aproximadamente el 0,27% (p/v).

En algunas realizaciones, la solución acuosa de trombina consiste esencialmente de trombina; sacárido o alcohol de azúcar; cloruro de sodio; albúmina; cloruro de calcio; y acetato de sodio.

En algunas realizaciones, el sacárido comprende un monosacárido (opcionalmente seleccionado del grupo que consiste de glucosa, fructosa, galactosa, xilosa y ribosa) y/o disacárido (opcionalmente seleccionado del grupo que consiste de sacarosa, maltosa y lactosa). En algunas realizaciones, el disacárido comprende sacarosa y/o maltosa, opcionalmente a una concentración de aproximadamente el 2% (p/v).

En algunas realizaciones, el alcohol de azúcar comprende un alcohol de azúcar derivado de monosacárido, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste de manitol, sorbitol y xilitol.

En algunas realizaciones, el azúcar derivado de monosacárido comprende manitol, opcionalmente a una concentración de aproximadamente el 2% (p/v).

En algunas realizaciones, el alcohol de azúcar es un alcohol de azúcar derivado de disacáridos, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste de maltitol, isomalt y lactitol.

5 En algunas realizaciones, la solución acuosa de trombina comprende un único sacárido (ya sea monosacárido o disacárido) o alcohol de azúcar. En algunas realizaciones, la solución acuosa de trombina carece de más de un tipo de sacárido o alcohol de azúcar. En algunas realizaciones, la solución acuosa de trombina carece de histidina. La solución acuosa de trombina carece de polietilenglicol.

10 En algunas realizaciones, el método comprende además, antes de la liofilización, ajustar el pH de la solución acuosa de trombina a un pH en el intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9.

15 En algunas realizaciones, la altura de la solución acuosa de trombina en un recipiente de liofilización, medida desde el punto más bajo del recipiente, no es mayor de aproximadamente 10 mm como, por ejemplo, aproximadamente 10 mm, aproximadamente 9 mm, aproximadamente 8 mm, mm, aproximadamente 7 mm, o aproximadamente 6 mm. En algunas realizaciones ejemplares, la altura es de aproximadamente 8 mm.

20 En algunas de tales realizaciones, en las que la altura de la solución acuosa de trombina no es mayor de aproximadamente 10 mm, el tiempo total de liofilización no es mayor de aproximadamente 35 horas, como por ejemplo, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 33 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 31 horas, aproximadamente 30 horas o aproximadamente 29 horas. En algunas realizaciones ejemplares, el tiempo total de liofilización no es superior a aproximadamente 30 horas.

25 En algunas realizaciones, en las que la altura de la solución acuosa de trombina no es mayor de aproximadamente 10 mm, el tiempo total de liofilización es más corto que el de un ciclo de liofilización usando una solución de control de idéntica altura en un recipiente de liofilización. Una "solución de control" tiene una composición que es diferente a la composición descrita en la presente. La composición de control puede ser diferente de la composición de la invención al comprender excipientes adicionales o de otro tipo y/o en las concentraciones de los excipientes individuales.

30 En algunas realizaciones, el tiempo total de liofilización en comparación con el que se usa con soluciones conocidas del estado de la técnica se reduce en aproximadamente un 37%.

35 En algunas realizaciones, la liofilización comprende: i) someter la solución acuosa de trombina a un procedimiento de congelación para producir una solución de trombina congelada; ii) someter la solución de trombina congelada del paso i) a un procedimiento de secado primario; y iii) someter el producto del paso ii) a un procedimiento de secado secundario.

40 En algunas realizaciones, el procedimiento de congelación se lleva a cabo a una temperatura de congelación de aproximadamente -45° C a aproximadamente -55° C. En algunas realizaciones, la liofilización se lleva a cabo en un estante liofilizador y el procedimiento de congelación comprende mantener el estante liofilizador a una temperatura de congelación (también denominada en la presente empapado de congelación) de aproximadamente -45° C a aproximadamente -55° C, como, por ejemplo, aproximadamente -50° C.

45 En algunas realizaciones, el procedimiento de congelación se lleva a cabo a una presión de aproximadamente 1 atmósfera.

50 En algunas realizaciones, en las que la altura de la solución acuosa de trombina en un recipiente de liofilización no es mayor de aproximadamente 10 mm (como aproximadamente 8 mm), la temperatura de congelación se mantiene durante no más de aproximadamente 5 horas.

55 En algunas realizaciones, la temperatura de congelación, como la temperatura del estante liofilizador, se alcanza durante un período (también denominado en la presente rampa de congelación) de no más de aproximadamente 2,5 horas.

60 En algunas realizaciones, el procedimiento de secado primario se lleva a cabo a de aproximadamente -12° C a aproximadamente -18° C. En algunas realizaciones, el procedimiento de secado primario comprende mantener el estante liofilizador a una temperatura de secado primaria (también denominada en la presente empapado de secado primario) de aproximadamente -12° C a aproximadamente -18° C, como aproximadamente -12° C, aproximadamente -13° C, aproximadamente -14° C, aproximadamente -15° C, aproximadamente -16° C, aproximadamente -17° C o aproximadamente -18° C, a una presión de aproximadamente 10 Pa (100 µBar) a aproximadamente 16 Pa (160 µBar). En algunas realizaciones ejemplares, la temperatura de secado primaria es de aproximadamente -15° C.

65 En algunas realizaciones, la temperatura de secado primaria, como la temperatura del estante liofilizador,

se alcanza durante un período (también denominado en la presente rampa de secado primaria) de aproximadamente 80 a aproximadamente 90 minutos.

5 En algunas realizaciones, en las que la altura de la solución acuosa de trombina en un recipiente de liofilización no es mayor de aproximadamente 10 mm (como, por ejemplo, aproximadamente 8 mm), la temperatura de secado primaria y la presión se mantienen durante no más de aproximadamente 13 horas como, por ejemplo, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 12 horas o aproximadamente 11 horas.

10 En algunas realizaciones, el procedimiento de secado secundario se lleva a cabo de aproximadamente 20° C a aproximadamente 30° C. En algunas realizaciones, el procedimiento de secado secundario comprende mantener el estante liofilizador a una temperatura de secado secundaria (también denominada en la presente empapado de secado secundario) de aproximadamente 20° C a aproximadamente 30° C (como, por ejemplo, aproximadamente 25° C) y una presión de menos de aproximadamente 5 Pa (50 µBar) como, por ejemplo, menos de aproximadamente 2 Pa (20 µBar).

15 En algunas realizaciones, la temperatura de secado secundaria se alcanza durante un período (también denominado rampa de secado secundaria) de aproximadamente 60 a aproximadamente 90 minutos.

20 En algunas realizaciones, en las que la altura de la solución acuosa de trombina en un recipiente de liofilización no es mayor de aproximadamente 10 mm (como, por ejemplo, aproximadamente 8 mm), la temperatura de secado secundaria y la presión se mantienen durante no más de aproximadamente 11 horas (como, por ejemplo, de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 11 horas).

25 En algunas realizaciones, el método comprende además, antes del procedimiento de secado secundario, un procedimiento de secado intermedio, llevado a cabo a de aproximadamente 5 a aproximadamente 15° C. En algunas realizaciones, el procedimiento de secado secundario comprende mantener el estante liofilizador a una temperatura de secado intermedia (también denominada en la presente empapado de secado intermedio) de aproximadamente 5 a aproximadamente 15° C como, por ejemplo, aproximadamente 10° C. En algunas de tales realizaciones, la presión durante el procedimiento de secado intermedio es de aproximadamente 12 Pa (120 µBar).

30 En algunas de tales realizaciones, la temperatura de secado intermedia se mantiene durante no más de aproximadamente 13 horas.

35 En algunas realizaciones, en las que la altura de la solución acuosa de trombina en un recipiente de liofilización no es mayor de aproximadamente 10 mm (como, por ejemplo, aproximadamente 8 mm), la liofilización en un estante liofilizador comprende:

- a) llevar la temperatura del estante liofilizador a una temperatura de congelación de aproximadamente -50°C, durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5 horas;
- 40 b) mantener la temperatura de congelación durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 horas;
- c) aumentar la temperatura del estante liofilizador del paso b) a una temperatura de secado primaria de aproximadamente -15° C y llevar la presión de aproximadamente 10 Pa (100 µBar) a aproximadamente 16 Pa (160 µBar), durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 90 minutos;
- 45 d) mantener la temperatura de secado primaria y la presión durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 11 a aproximadamente 13 horas;
- e) aumentar la temperatura del estante liofilizador del paso d) a una temperatura de secado secundaria de aproximadamente 25° C y disminuir la presión a menos de aproximadamente 5 Pa (50 µBar) durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 60 a aproximadamente 90 minutos; y
- 50 f) mantener la temperatura de secado secundaria y la presión del paso e) durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 11 horas.

En algunas realizaciones, los pasos a) y b) se llevan a cabo a presión atmosférica.

55 En algunas realizaciones, se proporciona una composición de trombina sólida que puede obtenerse de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente.

60 En algunas realizaciones, la composición de trombina sólida tiene un contenido de agua de no más de aproximadamente un 3% (p/p) y una recuperación de la actividad de trombina de por lo menos el 95%.

En algunas realizaciones, la composición de trombina sólida tiene un contenido de agua de no más de aproximadamente un 1,5% (p/p) y una recuperación de la actividad de trombina de por lo menos el 98%.

65 En algunas realizaciones, la composición de trombina sólida es estable durante por lo menos 2 años en condiciones de almacenamiento sin congelación, como a temperatura ambiente.

En algunas realizaciones, la composición de trombina sólida comprende de aproximadamente el 19,5% a aproximadamente el 78% (p/p de la composición total) de manitol, de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 20% (p/p de la composición total) de acetato de sodio; de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 53% (p/p de la composición total) de albúmina; de aproximadamente el 2,5% a aproximadamente el 31% (p/p de la composición total) de cloruro de calcio; y de aproximadamente el 6% a aproximadamente el 45% (p/p de composición total) de cloruro de sodio.

En algunas realizaciones, la composición de trombina sólida comprende de aproximadamente el 22% a aproximadamente el 66% (p/p de la composición total) de manitol, de aproximadamente el 1,5% a aproximadamente el 10% (p/p de la composición total) de acetato de sodio; de aproximadamente el 2,5% a aproximadamente el 43% (p/p de la composición total) de albúmina; de aproximadamente el 4% a aproximadamente el 17% (p/p de la composición total) de cloruro de calcio; y de aproximadamente el 9,5% a aproximadamente el 25% (p/p de la composición total) de cloruro de sodio.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una solución acuosa de trombina que comprende de aproximadamente el 1 a menos de aproximadamente el 4,6% (p/v) de sacárido o alcohol de azúcar; por lo menos de aproximadamente el 0,7 a menos de aproximadamente el 1,75% (p/v) de cloruro de sodio; de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 3% (p/v) de albúmina; de aproximadamente 200 a aproximadamente 2000 UI/ml de trombina; de aproximadamente el 0,3 a aproximadamente el 1,5% (p/v) de cloruro de calcio; y de aproximadamente el 0,14 a aproximadamente el 1% (p/v) de acetato de sodio; en donde la solución acuosa de trombina carece de polietilenglicol.

En algunas realizaciones, la solución acuosa de trombina comprende de aproximadamente el 1,6 a menos de aproximadamente el 4,6% (p/v) de sacárido o alcohol de azúcar; de aproximadamente el 0,7 a aproximadamente el 1,7% (p/v) de cloruro de sodio; más de aproximadamente el 0,2 a menos de aproximadamente el 3% de albúmina; de aproximadamente el 0,3 a aproximadamente el 1,2% (p/v) de cloruro de calcio; y de aproximadamente el 0,14 a aproximadamente el 0,7% (p/v) de acetato de sodio.

En algunas realizaciones de la solución acuosa de trombina, el sacárido o alcohol de azúcar está presente a una concentración de aproximadamente el 2% (p/v); la albúmina está presente a una concentración de aproximadamente el 0,6% (p/v), el cloruro de sodio está presente a una concentración de aproximadamente el 0,76% (p/v), el cloruro de calcio está presente a una concentración de aproximadamente el 0,6% (p/v) y el acetato de sodio está presente a una concentración de aproximadamente el 0,27% (p/v).

En algunas realizaciones, la solución acuosa de trombina consiste esencialmente de trombina; sacárido o alcohol de azúcar; cloruro de sodio; albúmina; cloruro de calcio; y acetato de sodio.

En algunas realizaciones, el sacárido es un monosacárido, como un monosacárido seleccionado del grupo que consiste de glucosa, fructosa, galactosa, xilosa y ribosa.

En algunas realizaciones, el sacárido es un disacárido, como un disacárido seleccionado del grupo que consiste de sacarosa, maltosa y lactosa.

En algunas realizaciones, el alcohol de azúcar comprende un alcohol de azúcar derivado de monosacáridos, como un alcohol de azúcar derivado de monosacáridos que se selecciona del grupo que consiste de manitol, sorbitol y xilitol. En algunas realizaciones, el alcohol de azúcar derivado de monosacáridos comprende manitol, opcionalmente a una concentración de aproximadamente el 2% (p/v).

En algunas realizaciones, la solución acuosa de trombina comprende un solo sacárido o alcohol de azúcar (como sacarosa sola, maltosa sola o manitol).

En algunas realizaciones, la solución acuosa de trombina carece de más de un tipo de sacárido o alcohol de azúcar.

En algunas realizaciones, la solución acuosa de trombina carece de histidina. La solución acuosa de trombina carece de polietilenglicol.

En algunas realizaciones, la trombina acuosa tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9.

En algunas realizaciones, la altura de la solución acuosa de trombina en un recipiente de liofilización no es mayor de aproximadamente 10 mm (como, por ejemplo, aproximadamente 8 mm). En algunas de tales realizaciones, el tiempo total de liofilización no es mayor de aproximadamente 35 horas.

En algunas realizaciones, la temperatura del estante liofilizador se lleva a la temperatura de congelación durante un

período no mayor de aproximadamente 2,5 horas.

En algunas realizaciones, el procedimiento de secado primario comprende mantener el estante liofilizador a una temperatura de secado primaria de aproximadamente -12° C a aproximadamente -18° C (como, por ejemplo, aproximadamente -15° C) a una presión de aproximadamente 10 Pa (100 µBar) a aproximadamente 16 Pa (160 µBar).

En algunas realizaciones, la temperatura del estante liofilizador se lleva a la temperatura de secado primaria durante un período (también denominado en la presente rampa de secado primaria) de aproximadamente 80 a aproximadamente 90 minutos.

En algunas realizaciones, en las que la altura de la solución acuosa de trombina en un recipiente de liofilización no es mayor de aproximadamente 10 mm (como, por ejemplo, aproximadamente 8 mm), la temperatura de secado primaria y la presión se mantienen durante no más de aproximadamente 13 horas (como, por ejemplo, de aproximadamente 11 a aproximadamente 13 horas).

En algunas realizaciones, el procedimiento de secado secundario comprende mantener el estante liofilizador del paso ii) a una temperatura de secado secundaria de aproximadamente 20° C a aproximadamente 30° C a una presión de menos de aproximadamente 5 Pa (50 µBar) (como, para ejemplo, menos de aproximadamente 2 Pa (20 µBar)).

En algunas realizaciones, la temperatura del estante liofilizador se lleva a la temperatura de secado secundaria durante un período de aproximadamente 60 a aproximadamente 90 minutos.

En algunas realizaciones, en las que la altura de la solución acuosa de trombina en un recipiente de liofilización no es mayor de aproximadamente 10 mm (como, por ejemplo, aproximadamente 8 mm), la temperatura de secado secundaria y la presión se mantienen durante no más de aproximadamente 11 horas (como, por ejemplo, de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 11 horas).

En algunas realizaciones, antes del paso iii), el estante liofilizador del paso ii) se mantiene a una temperatura de secado intermedia de aproximadamente 5 a aproximadamente 15° C (como, por ejemplo, aproximadamente 10°C).

En algunas realizaciones, el estante liofilizador del paso ii) se mantiene a la temperatura de secado intermedia a una presión de 12 Pa (120 µBar),

En algunas realizaciones, la temperatura de secado intermedia se mantiene durante no más de aproximadamente 13 horas.

En algunas realizaciones, en las que la altura de la solución acuosa de trombina en un recipiente de liofilización no es de más de aproximadamente 10 mm (como, por ejemplo, aproximadamente 8 mm), la liofilización en un estante de liofilizador comprende:

- a) llevar la temperatura del estante liofilizador a una temperatura de congelación de aproximadamente -50° C, durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5 horas;
- b) mantener la temperatura de congelación del paso a) durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 horas para producir una solución de trombina congelada;
- c) aumentar la temperatura del estante liofilizador del paso b) a una temperatura de secado primaria de aproximadamente -15° C y llevar la presión de aproximadamente 100 a aproximadamente 160 µBar, durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 90 minutos;
- d) mantener la temperatura de secado primaria y la presión durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 11 a aproximadamente 13 horas;
- e) aumentar la temperatura del estante liofilizador del paso d) hasta una temperatura de secado secundario de aproximadamente 25°C y disminuir la presión a menos de aproximadamente 50 µBar, durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 60 a aproximadamente 90 minutos; y
- f) mantener la temperatura de secado secundaria y la presión durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 11 horas,

En algunas realizaciones, los pasos a) y b) se llevan a cabo a presión atmosférica.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición de trombina sólida que puede obtenerse de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente.

En algunas realizaciones, la composición de trombina sólida tiene un contenido de agua de no más de aproximadamente un 3% (p/p) y una recuperación de la actividad de trombina de por lo menos el 95%.

En algunas realizaciones, la composición de trombina tiene un contenido de agua de no más de aproximadamente un 1,5% (p/p) y una recuperación de la actividad de trombina de por lo menos el 98%.

5 En algunas realizaciones, la composición de trombina sólida es estable durante por lo menos 2 años en condiciones de almacenamiento sin congelación (como a temperatura ambiente).

10 En algunas realizaciones, la composición de trombina sólida comprende de aproximadamente el 19,5% a aproximadamente el 78% (p/p de la composición total) de manitol, de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 20% (p/p de la composición total) de acetato de sodio; de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 53% (p/p de la composición total) de albúmina; de aproximadamente el 2,5% a aproximadamente el 31% (p/p de la composición total) de cloruro de calcio; y de aproximadamente el 6% a aproximadamente el 45% (p/p de la composición total) de cloruro de sodio.

15 En algunas realizaciones, la composición de trombina sólida comprende de aproximadamente el 22% a aproximadamente el 66% (p/p de la composición total) de manitol, de aproximadamente el 1,5% a aproximadamente el 10% (p/p de la composición total) de acetato de sodio; de aproximadamente el 2,5% a aproximadamente el 43% (p/p de la composición total) de albúmina; de aproximadamente el 4% a aproximadamente el 17% (p/p de la composición total) de cloruro de calcio; y de aproximadamente el 9,5% a aproximadamente el 25% (p/p de la composición total) de cloruro de sodio.

20 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Además, las descripciones, materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitativos. En las puestas en práctica de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente.

25 Como se usa en la presente, el término "torta" o "torta sólida" se refiere a una composición similar a una estructura porosa y esponjosa que resulta del proceso de liofilización.

30 Como se usa en la presente, el término "colapso" con respecto a una torta se refiere al punto en el que la torta ya no puede soportar su propia estructura.

35 Como se usa en la presente, el término "composición sólida" se refiere a una composición que tiene un contenido de agua igual o menor de aproximadamente el 3% (p/p) de agua, como igual o menor del 1,5%, en base al peso total del composición sólida.

40 Como se usa en la presente, el término "recuperación de la actividad de la trombina" se refiere a la actividad de la trombina en la composición sólida tras la reconstitución, en comparación con la actividad de la trombina inicial en la solución acuosa de trombina antes de la liofilización. Típicamente, la recuperación de la actividad se presenta en porcentaje.

45 Como se usa en la presente, el término "estable" con respecto a una composición de trombina liofilizada/sólida es, por ejemplo, una composición que puede soportar sustancialmente su propia estructura sin colapso de la torta, y/o una composición que retiene por lo menos el 80% de su actividad (por ejemplo, 90%, 95% o superior) durante por lo menos 2 años en condiciones de almacenamiento a temperatura no helada, por ejemplo, a una temperatura de 2-8° C y hasta una temperatura ambiente inferior a 25° C. En una realización de la invención, la composición sólida es estable durante 2 años cuando se almacena a temperatura ambiente. Típicamente, el colapso se caracteriza más evidentemente por la pérdida de estructura de la torta durante el secado. El colapso generalmente da como resultado una estructura cuyo volumen es significativamente menor que el volumen de la formulación usada para preparar la torta. Además, puede observarse una reducción del tamaño de poro medio y la porosidad así como un aumento en la densidad aparente.

50 El término "liofilización" se refiere típicamente al proceso de congelar una solución y luego reducir la concentración de agua, por ejemplo, por sublimación a niveles que no soportan reacciones biológicas o químicas. La composición liofilizada resultante puede almacenarse durante un período de tiempo relativamente largo. Después del almacenamiento, la composición liofilizada puede usarse como un polvo o puede reconstituirse mediante la adición de varios volúmenes de una solución acuosa. El volumen añadido durante la reconstitución puede ser similar al volumen de la solución antes de la liofilización, menor o mayor.

55 Como se usa en la presente, los términos "que comprende", "que incluye", "que tiene" y variantes gramaticales de los mismos deben tomarse como especificación de las características, números enteros, pasos o componentes indicados, pero no excluyen la adición de una o más características, números enteros, pasos, componentes o grupos de los mismos. Estos términos abarcan los términos "que consiste de" y "que consiste esencialmente de".

Como se usa en la presente, los artículos indefinidos "un" y "uno" significan "por lo menos uno" o "uno o más" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

5 Como se usa en la presente, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Las soluciones y métodos descritos en la presente permiten obtener una composición de trombina sólida mediante un ciclo de liofilización más corto en comparación con los métodos de liofilización conocidos actualmente en la técnica, aumentando de este modo la capacidad de liofilización y reduciendo los costes de producción. Las composiciones de trombina sólidas obtenidas usando las soluciones y métodos descritos en la presente tienen un bajo contenido de agua después de la liofilización, en comparación con las composiciones de trombina conocidas, son estables durante el almacenamiento a temperatura ambiente durante períodos de tiempo relativamente largos, y muestran un alto porcentaje de recuperación de la actividad de la trombina tras la reconstitución..

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Algunas realizaciones de la invención se describen en la presente con referencia a las figuras acompañantes. La descripción, junto con las figuras, hace evidente para un experto en la técnica cómo pueden ponerse en práctica algunas realizaciones de la invención. Las figuras tienen el propósito de un análisis ilustrativo y no se intenta mostrar detalles estructurales de una realización con más detalle de lo necesario para una comprensión fundamental de la invención. En aras de la claridad, algunos objetos representados en las figuras no están a escala.

En las Figuras:
25 La Fig. 1 muestra el aspecto visual de una torta obtenida después de un ciclo de liofilización corto ejemplar como se describe en la presente.

DESCRIPCIÓN DE ALGUNAS REALIZACIONES DE LA INVENCION

30 La invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a métodos para la liofilización de una solución acuosa de trombina, soluciones de trombina para usar en tales métodos de liofilización, y composiciones sólidas de trombina producidas mediante tales métodos.

Los principios, usos e implementaciones de las enseñanzas de la presente pueden entenderse mejor con referencia a la descripción acompañante. Tras la lectura de la descripción, un experto en la técnica puede implementar la invención sin un esfuerzo o experimentación indebidos.

40 Antes de explicar por lo menos una realización con detalle, debe entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes y/o métodos expuestos en la siguiente descripción. La invención es susceptible de otras realizaciones o de ser puesta en práctica o llevada a cabo de varias maneras. La fraseología y terminología empleadas en la presente tienen un propósito descriptivo y no deben considerarse limitativas.

45 Como se ha mencionado anteriormente, las soluciones de trombina conocidas varían considerablemente en el número y tipos de excipientes presentes y en las concentraciones de los excipientes individuales.

EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

50 Solución madre de trombina:

La solución madre de trombina usada para preparar las soluciones acuosas de trombina descritas en los Ejemplos siguientes comprendía aproximadamente 3500 UI/ml de trombina, aproximadamente 200 mM de NaCl, con estabilizadores manitol al 2% y albúmina de suero humano (HSA) al 0,2% (a menos que se indique lo contrario). La solución madre se preparó a partir del Factor II (protrombina) de plasma humano que se activó y purificó mediante el uso secuencial de resina de intercambio aniónico de dietilaminoetil (DEAE) celulosa y resina intercambiadora de cationes SP, esencialmente como se describe en Patente de Estados Unidos 5143838.

60 Liofilización:

A. Liofilización de una solución de trombina de 8 mm de altura dentro del recipiente de liofilización:

65 La liofilización se llevó a cabo en un estante liofilizador de un secador por congelación Christ Epsilon 2-8D (Christ, Alemania) en viales de vidrio siliconizado de 8 ml (Schott, Alemania). Cada vial se llenó con 2 ml de solución

acuosa de trombina. La altura de la solución en cada vial fue de aproximadamente 8 mm.

Se llevaron a cabo dos ciclos cortos de liofilización diferentes como se especifica en la Tabla 1 (un tiempo total de 34 horas) y la Tabla 2 (un tiempo total de 30 horas) a continuación. Las temperaturas dadas son las del estante liofilizador.

Después de la liofilización, se obtuvo una composición de trombina sólida que tenía un volumen similar al volumen de la solución acuosa antes de la liofilización.

Tabla 1

Paso	Duración (hr:min)	Presión (Pa (μbar))	Temperatura (°C)
Rampa de congelación	2	Atm	RT a -50°C
Empapado de congelación	5	Atm	-50°C
Rampa de secado primaria	1:30	Atm a 14 Pa (140 μBar)	-50°C a -15°C
Empapado de secado primario	13	14 Pa (140 μBar)	-15°C
Rampa de secado secundaria	1:30	14 Pa (140 μBar) a 1.2 Pa (12 μBar)	-15°C a 25°C
Empapado de secado secundario	11	1.2 Pa (12 μBar)	25°C
Tiempo total	34		

Como se usa en la presente, el término "empapado" con respecto a un proceso de congelación o secado se refiere a mantener la composición que se está liofilizando a una temperatura y presión constantes durante un período de tiempo específico para efectuar la congelación o el secado, respectivamente.

Como se usa en la presente, el término "rampa" con respecto a un proceso de congelación o secado se refiere a un paso en la que la temperatura y la presión de la composición que se está liofilizando se cambian gradualmente durante un período de tiempo especificado para llevar la composición a una temperatura y presión de congelación o secado especificadas respectivamente.

Tabla 2

Paso	Duración (hr:min)	Presión (Pa (μBar))	Temperatura (°C)
Rampa de congelación	2	Atm	RT a -50°C
Empapado de congelación	4:40	Atm	-50°C
Rampa de secado primaria	1:20	Atm a 14 Pa (140 μBar)	-50°C a -15°C
Empapado de secado primario	11	14 Pa (140 μBar)	-15°C
Rampa de secado secundaria	1:30	14 Pa (140 μBar) a 1.2 Pa (12 μBar)	-15°C a 25°C
Empapado de secado secundario	9:30	1.2 Pa (12 μBar)	25°C
Tiempo total	30		

B. Liofilización de una solución de trombina de 17 mm de altura dentro del recipiente de liofilización (ejemplo de referencia):

La liofilización se llevó a cabo en un estante liofilizador de un secador por congelación Christ Epsilon 2-8D (Christ, Alemania) en vasos LYOGUARD® (GORE®). Cada vial se llenó con 52 ml de solución acuosa de trombina. La altura de la solución en cada vial fue de aproximadamente 17 mm.

Se llevaron a cabo ciclos cortos de liofilización como se especifica en la Tabla 3 (un tiempo total de 68 horas). Las temperaturas dadas son las del estante liofilizador.

Después de la liofilización, se obtuvo una composición de trombina sólida que tenía un volumen similar al volumen de la solución acuosa antes de la liofilización.

Tabla 3

Paso	Duración (hr:min)	Presión (Pa (μBar))	Temperatura (°C)
Rampa de congelación	2:00	Atm	RT a -50°C
Empapado de congelación	5:40	Atm	-50°C
Rampa de secado primaria	0:50	Atm a 12 Pa (120 μBar)	-50°C a -15°C
Secado primario	31:00	12 Pa (120 μBar)	-15°C
Rampa de secado intermedia	0:30	12 Pa (120 μBar)	-15°C a 10°C
Secado intermedio	12:00	12 Pa (120 μBar)	10°C
Rampa de secado secundaria	1:00	14 Pa (140 μBar) a 1.2 Pa (12 μBar)	10°C a 25°C
Secado secundario	15:00	1.2 Pa (12 μBar)	25°C
Tiempo total	68:00		

Cuantificación del contenido de agua dentro de la composición de trombina liofilizada:

La determinación del contenido de agua se llevó a cabo usando el método de titulación volumétrica de Karl Fischer (KFT), que se basa en el ensayo de la Farmacopea de Estados Unidos (USP 27, <921>, p. 2398-2399). Antes de la titulación, se extrajo el agua de la composición liofilizada añadiendo metanol seco al vial que contenía la composición liofilizada y agitando el vial. Se extrajo una muestra del sobrenadante para la titulación.

Determinación de la actividad de la trombina:

La actividad de trombina de las soluciones acuosas de trombina se determinó usando un ensayo de tiempo de coagulación midiendo la actividad de coagulación de la trombina en las diferentes soluciones de acuerdo con el procedimiento de Ensayo de la Farmacopea Europea (0903/1997) modificado. Brevemente, se incubaron soluciones estándar de trombina (4, 6, 8 y 10 UI/ml) o las soluciones de prueba durante 2 minutos a 37° C. Luego, se mezclaron 40 μl de cada solución de prueba o solución estándar con 160 μl de solución de fibrinógeno (0,1%; Enzyme research; N° de cat. FIB1 2800L) y se midió el tiempo de coagulación. Se trazó una curva de calibración de los tiempos de coagulación logarítmicos frente a la concentración logarítmica de trombina usando los estándares. La actividad de trombina en las diferentes soluciones de prueba se determinó mediante el tiempo de coagulación obtenido (calculado automáticamente por una máquina de coagulación (Diagnostica Stago STart Coagulation Analyzer) interpolado de la curva de calibración y multiplicado por el factor de dilución).

Recuperación de la actividad de la trombina tras la reconstitución (% de la actividad inicial):

La actividad de la trombina se midió como se ha descrito anteriormente en las soluciones de prueba antes de la liofilización, y en la composición de trombina sólida obtenida por liofilización, después de la reconstitución con agua purificada al volumen original. La actividad recuperada se calculó dividiendo la actividad obtenida en la composición de trombina sólida después de la reconstitución por la actividad obtenida en la solución de trombina antes de la liofilización y multiplicando por 100.

Evaluación cualitativa y cuantitativa de composiciones sólidas de trombina obtenidas mediante un proceso de liofilización corto:

Las composiciones sólidas de trombina obtenidas sometiendo diferentes soluciones acuosas de trombina a un ciclo corto de liofilización se evaluaron mediante los siguientes parámetros: contenido de agua de las composiciones sólidas, recuperación de la actividad de la trombina tras la reconstitución de las composiciones sólidas y apariencia estructural de la torta (mediante inspección visual). Típicamente, una torta que tiene una "buena apariencia estructural" se define como una torta que tiene un volumen similar al de la solución acuosa de trombina antes de la liofilización, es un bloque monolítico, tiene una porosidad uniforme en toda la composición sólida y no tiene áreas húmedas aparentes..

Para determinar el efecto de un proceso de liofilización corto sobre diferentes formulaciones de trombina, se prepararon varias soluciones acuosas de trombina que comprenden diferentes ingredientes, por ejemplo, diferentes sacáridos, sales y excipientes a diferentes concentraciones a partir de la solución madre de trombina descrita en la sección de "MATERIALES Y MÉTODOS" y las soluciones se liofilizaron luego usando el ciclo de liofilización corto, como se detalla en las Tablas 1, 2 o 3.

Ejemplo 1: Uso de diferentes sacáridos y concentraciones o un alcohol de azúcar en una solución de trombina sometida a un ciclo de liofilización corto

Se usaron disacáridos (sacarosa y maltosa) y un alcohol de azúcar (manitol) a diferentes concentraciones en la preparación de soluciones acuosas de trombina, y se estudiaron composiciones sólidas de trombina obtenidas mediante el uso de tales soluciones de trombina en un ciclo de liofilización corto.

El manitol se probó a concentraciones del 1,6%, 2,1%, 2,6% y 4,6% (p/v) mediante la adición de manitol a la solución madre diluida como se describe a continuación; y se probaron sacarosa y maltosa a una concentración del 2% (p/v). [Para preparar las soluciones de prueba de trombina, la solución madre de trombina descrita anteriormente se diluyó 1:3,5 con una solución que proporcionó las siguientes composiciones finales: 0,6% de albúmina de suero humano, acetato de sodio 20 mM (0,27%), NaCl 130 mM (0,76%) y 0,6% de CaCl₂ en agua a pH 7,0, y el sacárido o azúcar alcohol probado se añadió a la solución en las concentraciones enumeradas anteriormente. En el caso del manitol, la solución se suplementó a la concentración enumerada (después de la dilución de la solución madre, la solución comprendía aproximadamente un 0,6% de manitol).

Es de destacar que la albúmina de suero humano presente en la solución madre de trombina también estaba presente en todas las soluciones de prueba como "ingrediente de fondo" en una concentración de aproximadamente el 0,06%. Además, la solución madre comprendía manitol al 0,6%.

Las soluciones acuosas de trombina preparadas se liofilizaron usando el ciclo de liofilización corto como se ha descrito en la Tabla 2 anterior, para obtener composiciones de trombina sólidas. Se midieron el contenido de agua de cada composición sólida y la recuperación de la actividad de trombina después de la reconstitución de la composición liofilizada. Los resultados se presentan en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

Sacárido/alcohol de azúcar probado	Contenido de agua en la composición sólida (%)	Recuperación de Actividad de Trombina
Sacarosa 2%	0.4	96
Maltosa 2%	0.6	95
Manitol 1.6%	0.6	100
Manitol 2.1%	ND	100
Manitol 2.6%	0.6	98
Manitol 4.6%	1.7	100

Los resultados mostraron que cada uno de los sacáridos y alcoholes de azúcar probados, cuando están presentes en la solución acuosa de trombina a una concentración del 2,6% o menos, dieron como resultado composiciones de trombina sólidas con un bajo contenido de agua (0,4-0,6%) después de un ciclo de liofilización corto, y alta recuperación de la actividad de la trombina (95-100%) después de la reconstitución de la composición sólida.

Los resultados también mostraron que las soluciones acuosas de trombina dieron como resultado tortas que mantuvieron su estructura sin colapsar y que tenían un buen aspecto estructural como se ha definido anteriormente.

Por el contrario, una solución acuosa de trombina que comprende un 4,6% de manitol, cuando se somete a un ciclo de liofilización corto, dio como resultado una torta encogida con un contenido de agua superior al 1,7%.

Estos resultados muestran que una solución acuosa de trombina para usar en un ciclo de liofilización corto comprende ventajosamente de aproximadamente el 1,6% a menos de aproximadamente el 4,6% de sacáridos o alcoholes de azúcar para obtener una composición de trombina sólida y estable (estructural y funcionalmente).

Ejemplo 2: Uso de diferentes concentraciones de albúmina de suero humano en una solución de trombina sometida a un ciclo de liofilización corto

Se usaron diferentes concentraciones de HSA en la preparación de soluciones acuosas de trombina, y se estudiaron las composiciones sólidas de trombina obtenidas mediante el uso de tales soluciones de trombina en un ciclo de liofilización corto.

La HSA se probó a las siguientes concentraciones: 0,2%, 0,6%, 3% y 10%.

Las soluciones se prepararon a partir de la solución madre de trombina mediante una dilución 1:3,5 con una solución que proporcionó la siguiente composición final: 2,6% de manitol, acetato de sodio 20 mM (0,27%), NaCl 130 mM (0,76%) y 0,6% de CaCl_2 en agua. a pH 7,0.

Es de destacar que la albúmina de suero humano estaba presente en todas las soluciones de prueba a una concentración de aproximadamente el 0,06%, (además de las concentraciones de HSA añadidas enumeradas anteriormente).

Las soluciones acuosas de trombina preparadas se liofilizaron usando el ciclo de liofilización corto descrito en la Tabla 2 anterior, en donde la solución tenía una altura de aproximadamente 8 mm en el recipiente de liofilización, para obtener composiciones sólidas de trombina. Se midieron el contenido de agua de cada composición sólida y la recuperación de la actividad de la trombina después de la reconstitución de la composición sólida. Los resultados se presentan en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5

Concentración de HSA (%)	Contenido de agua en la composición sólida (%)	Recuperación de Actividad de Trombina (%)
0.2	3.0	100
0.6	0.6	98
3	ND	89
10 (ejemplo de referencia)	0.3	28

Los resultados mostraron que el cambio de la concentración de HSA tuvo un efecto significativo sobre el contenido de agua en la composición sólida de trombina y sobre la recuperación de la actividad de la trombina después de la reconstitución de la composición sólida.

Más específicamente, se demostró que una solución de trombina que contenía un 0,6% de HSA daba como resultado una composición sólida con un contenido de agua relativamente bajo y una alta recuperación de la actividad de la trombina tras la reconstitución. Por el contrario, las soluciones de trombina con concentraciones más bajas de HSA dieron como resultado composiciones sólidas con mayor contenido de agua, mientras que las soluciones con concentraciones más altas de HSA dieron como resultado una menor recuperación de la actividad de la trombina tras la reconstitución.

Por lo tanto, se muestra que las soluciones de trombina óptimas comprenden ventajosamente HSA a una concentración de más de aproximadamente el 0,2% a menos de aproximadamente el 3%.

Ejemplo 3: Uso de diferentes sales y concentraciones en una solución de trombina sometida a un ciclo de liofilización corto

A. Efecto de la concentración de cloruro de sodio (NaCl):

Se usaron diferentes concentraciones de NaCl (90 mM, 120 mM y 150 mM, es decir, 0,5% p/v, 0,7 p/v y 0,9 p/v, respectivamente) en la preparación de soluciones acuosas que carecían de trombina y se obtuvieron composiciones sólidas mediante el uso de tales soluciones en un ciclo de liofilización corto, en el que la altura de las soluciones en un recipiente de liofilización fue de aproximadamente 8 mm.

Las soluciones contenían, además de las diferentes concentraciones de NaCl, 2% de manitol, 0,6% de HSA, acetato de sodio 20 mM (0,27%) y 0,6% de CaCl_2 a pH 7,0.

Las soluciones se liofilizaron usando un ciclo corto similar al descrito en la Tabla 2 anterior, en donde la altura de la solución en el recipiente de liofilización fue de aproximadamente 8 mm, en donde el empapado de secado primario fue una hora más que el descrito en la Tabla 2.

Después de la liofilización, se probó el contenido de agua en la composición sólida. Los resultados se presentan en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6

Concentración de NaCl	Contenido de agua en la composición sólida (%)
90 mM/0.5% p/v	3%
120 mM/0.7% p/v	1.2%
150 mM/0.9% p/v	<1.2%

Como se muestra en la Tabla, el contenido de agua fue inversamente proporcional a la concentración de NaCl hasta 150 mM.

En experimentos similares adicionales que usaban soluciones de trombina y soluciones desprovistas de trombina (datos no mostrados), no se encontró ninguna disminución adicional en el contenido de agua cuando la concentración de NaCl aumentó más allá de 150 mM.

Las concentraciones de NaCl de 300 mM (1,75% p/v) y superiores tuvieron un efecto inhibitor sobre la actividad de la trombina como se midió mediante el ensayo del tiempo de coagulación (datos no mostrados).

Con respecto a la apariencia estructural de la composición sólida, una torta preparada a partir de una solución que comprende 90 mM de NaCl tenía un aspecto pobre, se encogía en comparación con el volumen de la solución a partir de la cual se preparó y tenía una consistencia granular, con una porosidad no uniforme en toda la composición sólida.

Por lo tanto, se concluyó que las soluciones de trombina ventajosamente óptimas comprenden NaCl a una concentración de por lo menos 120 mM (0,7% p/v) a menos de 300 mM (1,75% p/v).

B. Efecto de la sustitución parcial de NaCl por cloruro de potasio (KCl)

Se evaluó el uso potencial de KCl en lugar de NaCl en la solución de trombina. Como el NaCl está presente en la solución madre de trombina usada para preparar las soluciones de prueba, no puede eliminarse completamente y, por lo tanto, la solución se suplementó con KCl 65 mM (llevando la solución a una concentración final de sal de aproximadamente 125 mM). Además, se probó una solución de trombina adicional, que comprendía la solución madre suplementada con NaCl, llevando la solución a una concentración final de sal de 130 mM).

Se prepararon soluciones suplementadas con NaCl o con KCl diluyendo la solución madre a 1:3,5, para proporcionar una concentración de NaCl de 60 mM. Luego, se suplementó una primera solución hasta una concentración de NaCl de 130 mM; y una segunda solución se suplementó con KCl 65 mM.

La solución madre se diluyó para proporcionar la siguiente composición final: 2,6% de manitol, acetato de sodio 20 mM (0,27%), y 0,6% de CaCl_2 en agua a pH 7,0.

Las soluciones preparadas se liofilizaron usando el ciclo de liofilización corto descrito en la Tabla 2 anterior, en donde la solución tiene una altura en el recipiente de liofilización de aproximadamente 8 mm, y se midieron el contenido de agua en las composiciones sólidas y la recuperación de la actividad de trombina después de la reconstitución de la composición sólida. Los resultados se presentan en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7

Sal probada	Contenido de agua en la composición sólida (%)	Recuperación de Actividad de Trombina (%)
130 mM NaCl (0.76% p/v)	0.6	98
65 mM (0.49% p/v) KCl; y 60 mM (0.35% p/v) NaCl (ejemplo de referencia)	5.2	100

Se descubrió que el reemplazo parcial de NaCl por KCl en la solución tuvo un efecto perjudicial sobre el contenido de agua de la composición de trombina sólida obtenida después de un ciclo de liofilización corto (5,2% de contenido de agua de la composición sólida después de la liofilización de una solución que contenía NaCl más KCl, en comparación con el 0,6% después de la liofilización de una solución que contiene NaCl sin KCl). Se obtuvo una recuperación de la actividad de la trombina similar después de la reconstitución de una composición sólida obtenida de la liofilización de una solución que comprende NaCl 130 mM y una solución que comprende KCl 65 mM y NaCl 60

mM, como se muestra en la Tabla 7.

La inspección visual de la apariencia estructural de la composición sólida reveló que el reemplazo de NaCl por KCl dio como resultado una torta encogida.

Por tanto, se llegó a la conclusión de que, ventajosamente, para obtener una composición sólida con un contenido de agua relativamente bajo, se prefiere que el KCl esté ausente en la solución de trombina.

Se concluye además que una solución acuosa de trombina óptima que produce una composición sólida con bajo contenido de agua y una alta recuperación de la actividad de la trombina después de la liofilización usando un ciclo corto comprende de aproximadamente el 1,6% a menos de aproximadamente el 4,6% de sacárido o alcohol de azúcar, por lo menos aproximadamente 120 mM (0,7% p/v) a menos de aproximadamente 300 mM (1,75% p/v) de cloruro de sodio, y más de aproximadamente el 0,2% a menos de aproximadamente el 3% de albúmina, además de aproximadamente el 0,3 a aproximadamente el 1,2% de cloruro de calcio; y acetato de sodio de aproximadamente el 0,14 a aproximadamente el 0,7%.

Ejemplo 4: Uso de las soluciones descritas en la presente y soluciones similares a las del estado de la técnica en un ciclo de liofilización corto con una altura de solución en un recipiente de liofilización de 8 mm

Se prepararon tres soluciones: una solución como se describe en la presente, y dos soluciones que son similares a las soluciones del estado de la técnica, de la siguiente manera:

1. Una solución de trombina como se describe en la presente, que comprende 2% de manitol, 0,6% de albúmina de suero humano, acetato de sodio 20 mM (0,27%), cloruro de sodio 130 mM (0,76%) y CaCl_2 40 mM (0,6%) en agua destilada a pH 7,0.
2. Una solución de trombina similar a la divulgada en la EP 1766003B1 (Jiang et al.), que comprende 3% de sacarosa, 4% de manitol, NaCl 150 mM (0,9%), 0,1% de polietilenglicol 3350 (PEG3350), CaCl_2 4 mM (0,04%); e histidina 5 mM (0,08%) en agua destilada a pH 6,0.
3. Una solución de trombina similar a la divulgada en la EP 813598B1 (MacGregor et al.), que comprende ácido glucónico 40 mM (0,78%), citrato trisódico 20 mM (0,5%) y NaCl 150 mM (0,9%) en agua destilada a pH 6,5.

Los componentes de las soluciones se presentan con más detalle en la Tabla 8.

Tabla 8

	Solución 1	Solución 2	Solución 3
Manitol	2%	4%	--
Albumina	0.6%	--	--
Acetato de sodio	0.27%	--	--
Cloruro de sodio	0.76%	0.9%	0.9%
Cloruro de calcio	0.6%	4 mM (0.04%)	--
Sacarosa	--	3%	--
PEG	--	0.1%	--
Histidina	--	5 mM (0.08%)	--
Ácido glucónico	--	-	40 mM (0.78%)
Citrato trisódico	--	--	20 mM (0.5%)

Las tres soluciones de trombina se prepararon diluyendo la solución madre de trombina descrita anteriormente a 1:3,5 con una solución que comprende los ingredientes enumerados en cada solución 1-3. El manitol y la albúmina de suero humano estaban presentes en las tres soluciones de prueba a una concentración de aproximadamente el 0,6% y 0,06%, respectivamente, como ingredientes de fondo.

Las soluciones se liofilizaron usando los ciclos cortos de liofilización descritos en la Tabla 1 o la Tabla 2 anteriores (en los que la altura de la solución en el recipiente de liofilización era de aproximadamente 8 mm). Se midieron el contenido de agua de la composición de trombina sólida y la recuperación de la actividad de la trombina después de la reconstitución de la composición de trombina sólida, como se ha descrito anteriormente.

La Fig. 1 muestra la apariencia visual de una composición de trombina sólida obtenida después de una liofilización corta de la solución acuosa de trombina descrita en la presente (solución 1; N° 1 en la Fig. 1); y una

composición sólida de trombina obtenida tras una breve liofilización de una solución de acuerdo con la EP 1766003B1 (solución 2; N° 2 en la Fig. 1). La composición sólida que se muestra en la Fig. 1 se obtuvo usando el ciclo como se describe en la Tabla 1. Se obtuvieron resultados similares cuando se usó el ciclo como se describe en la Tabla 2.

La inspección visual de la apariencia de las composiciones sólidas de trombina reveló que las composiciones sólidas obtenidas tras la liofilización de la solución de trombina de acuerdo con la invención y de la solución 3 tenían una "buena apariencia estructural" de acuerdo con la definición analizada anteriormente. Sin embargo, la torta obtenida tras el uso de la solución de trombina de acuerdo con la EP 1766003B1 (solución 2) en el ciclo corto de liofilización tenía una estructura granulada.

El contenido de agua en las tres composiciones sólidas de trombina y la recuperación de la actividad de trombina de las composiciones sólidas se presentan en la Tabla 9 a continuación.

Tabla 9

Solución de trombina probada	Contenido de agua en la composición sólida (%)		Contenido de agua medio (%) $\pm$ SD	Recuperación de Actividad de Trombina (%)		Recuperación de Actividad de Trombina media (%) $\pm$ SD
	Ciclo de la Tabla 1	Ciclo de la Tabla 2		Ciclo de la Tabla 1	Ciclo de la Tabla 2	
Solución 1	0.8	0.6	0.7 $\pm$ 0.14	100	98	99 $\pm$ 1.4
Solución 2	3.2	4.1	3.65 $\pm$ 0.64	92	96	94 $\pm$ 2.8
Solución 3	1.6	3.3	2.45 $\pm$ 1.2	93	91	92 $\pm$ 1.4

Como se muestra en la Tabla 9, se descubrió que después del ciclo de liofilización corto (como se describe en las Tablas 1 o 2), el contenido de agua medio más bajo se encontró en la composición sólida liofilizada preparada usando la solución descrita en la presente (0,7 $\pm$ 0,14%).

Como se muestra adicionalmente en la Tabla 9, se descubrió que después de la reconstitución de las composiciones sólidas liofilizadas con ciclo corto, se obtuvo la mayor recuperación de actividad de trombina en las composiciones sólidas preparadas usando la solución descrita en la presente (99 $\pm$ 1,4%) de acuerdo con las Tablas 1 o 2.

Ejemplo 5: Uso de las soluciones descritas en la presente en un ciclo de liofilización corto con una altura de solución en recipiente de liofilización de 17 mm (ejemplo de referencia)

Se liofilizaron una primera solución de trombina como se describe en la presente, que comprende 2% de manitol, 0,6% de albúmina de suero humano, acetato de sodio 20 mM (0,27%), cloruro de sodio 130 mM (0,76%) y CaCl₂ 40 mM (0,6%) en agua destilada a pH 7,0; y una segunda solución, similar a la primera solución, pero que comprende una concentración de cloruro de sodio inferior a 120 mM (0,7%), cloruro de sodio (inferior a 0,76%). La primera solución se liofilizó usando los ciclos cortos de liofilización descritos en la Tabla 3 anterior; y la segunda solución (con la menor concentración de cloruro de sodio) se liofilizó en un ciclo de liofilización que tenía una duración de 108 horas (en el que la altura de cada solución en el recipiente de liofilización era de aproximadamente 17 mm).

Se midieron el contenido de agua de ambas composiciones de trombina sólida, y la recuperación de la actividad de la trombina después de la reconstitución de ambas composiciones de trombina sólida, como se ha descrito anteriormente.

En ambas composiciones sólidas, el contenido de agua fue del 1,5% y la recuperación de la actividad de la trombina fue del 100%.

Los resultados muestran que la solución de trombina de acuerdo con la invención permitió acortar la duración del ciclo de liofilización en aproximadamente un 37%. En conclusión, la solución de trombina descrita en la presente permite ventajosamente el uso de un ciclo de liofilización corto que produce una composición sólida que tiene un bajo contenido de agua y una alta recuperación de la actividad de trombina en comparación con las soluciones de trombina conocidas.

Se apreciará que ciertas características de la invención, que, para mayor claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. A la inversa, varias características de la invención, que se describen, por brevedad, en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como

adecuadas en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de varias realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización no funcione sin esos elementos.

5 Aunque la invención ha sido descrita junto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que serán evidentes para los expertos en la técnica muchas alternativas, modificaciones y variaciones. Por consiguiente, se pretende abarcar todas estas alternativas, modificaciones y variaciones que caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10 La cita o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no se interpretará como una admisión de que dicha referencia está disponible como estado de la técnica de la invención.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para la liofilización de una solución acuosa de trombina, el método comprendiendo:

- 5 proporcionar la solución acuosa de trombina que comprende de aproximadamente el 1 a menos de aproximadamente el 4,6% (p/v) de un sacárido o alcohol de azúcar; por lo menos aproximadamente el 0,7 a menos de aproximadamente el 1,75% (p/v) de cloruro de sodio; de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 3% (p/v) de albúmina; cloruro de calcio; y acetato de sodio; y
- 10 liofilizar la solución acuosa de trombina;
- en donde la altura de la solución acuosa de trombina en un recipiente de liofilización no es mayor de 10 mm, en donde el tiempo total de liofilización no es mayor de 35 horas, y en donde la solución acuosa de trombina carece de polietilenglicol;
- en donde el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde la solución acuosa de trombina comprende de aproximadamente 200 a aproximadamente 2000 UI/ml de trombina; de aproximadamente el 0,3 a aproximadamente el 1,5% (p/v) de cloruro de calcio; y de aproximadamente el 0,14 a aproximadamente el 1% (p/v) de acetato de sodio;
- en donde el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

- 20 3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la solución acuosa de trombina comprende; de aproximadamente el 1,6 a menos de aproximadamente el 4,6% (p/v) de sacárido o alcohol de azúcar; de aproximadamente el 0,7 a aproximadamente el 1,7% (p/v) de cloruro de sodio; más de aproximadamente el 0,2 a menos de aproximadamente el 3% de albúmina (p/v); de aproximadamente el 0,3 a aproximadamente el 1,2% (p/v) de cloruro de calcio; y de aproximadamente el 0,14 a aproximadamente el 0,7% (p/v) de acetato de sodio;
- 25 en donde el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

4. El método de la reivindicación 3, en donde el sacárido o alcohol de azúcar está presente a una concentración del 2% (p/v); la albúmina está presente a una concentración de aproximadamente el 0,6% (p/v); el cloruro de sodio está presente en una concentración de aproximadamente el 0,76% (p/v); el cloruro de calcio está presente a una concentración de aproximadamente el 0,6% (p/v) y el acetato de sodio está presente a una concentración de aproximadamente el 0,27% (p/v);
- 30 en donde el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la solución acuosa de trombina consistiendo esencialmente de trombina; sacárido o alcohol de azúcar; cloruro de sodio; albúmina; cloruro de calcio; y acetato de sodio.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el sacárido comprende un mono- y/o disacárido, en donde opcionalmente el disacárido es sacarosa o maltosa;
- 40 o en donde dicho alcohol de azúcar comprende un alcohol de azúcar derivado de monosacárido, opcionalmente en donde el alcohol de azúcar derivado de monosacárido es manitol y está opcionalmente presente en una concentración de aproximadamente el 2% (p/v);
- en donde el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la solución acuosa de trombina comprende un único sacárido o alcohol de azúcar.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la solución acuosa de trombina carece de histidina.

- 50 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además, antes de la liofilización, ajustar el pH de la solución acuosa de trombina a un pH en el intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9;
- en donde el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la liofilización se lleva a cabo en un estante liofilizador y comprende:

- i. someter la solución acuosa de trombina a un procedimiento de congelación para producir una solución de trombina congelada;
- ii. someter la solución de trombina congelada del paso i) a un procedimiento de secado primario; y
- 60 iii. someter el producto del paso ii) a un procedimiento de secado secundario;

- en donde el procedimiento de congelación comprende opcionalmente mantener el estante liofilizador a una temperatura de congelación de aproximadamente -45°C a aproximadamente -55°C , opcionalmente aproximadamente -50°C ; y en donde el procedimiento de congelación se lleva a cabo opcionalmente a una presión de aproximadamente 1 atmósfera;

en donde el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

11. El método de la reivindicación 10, en donde el estante liofilizador se mantiene a la temperatura de congelación durante no más de aproximadamente 5 horas y/o en donde la temperatura del estante liofilizador se lleva a la temperatura de congelación durante un período de no más de aproximadamente 2,5 horas; en donde el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

12. El método de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde el procedimiento de secado primario comprende mantener el estante liofilizador a una temperatura de secado primaria de aproximadamente -12°C a aproximadamente -18°C , opcionalmente aproximadamente -15°C , a una presión de aproximadamente 100 μBar a aproximadamente 160 μBar ; en donde el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

13. El método de la reivindicación 12, en donde la temperatura de secado primaria y la presión se mantienen durante no más de aproximadamente 13 horas, opcionalmente durante de aproximadamente 11 a aproximadamente 13 horas; en donde el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en donde el procedimiento de secado secundario comprende mantener el estante liofilizador a una temperatura de secado secundario de aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C , opcionalmente aproximadamente 25°C , y una presión de menos de aproximadamente 50 μBar , opcionalmente menos de aproximadamente 20 μBar ; en donde el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

15. El método de la reivindicación 14, en donde la temperatura de secado secundaria y la presión se mantienen durante no más de aproximadamente 11 horas, opcionalmente durante de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 11 horas; en donde el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

16. El método de la reivindicación 10, en donde la liofilización en un estante de liofilizador comprende:

- a) llevar la temperatura del estante liofilizador a una temperatura de congelación de aproximadamente -50°C , durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5 horas;
- b) mantener la temperatura de congelación del paso a) durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 horas para producir una solución de trombina congelada;
- c) aumentar la temperatura del estante liofilizador del paso b) a una temperatura de secado primaria de aproximadamente -15°C , y llevar la presión de aproximadamente 100 a aproximadamente 160 μBar durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 90 minutos;
- d) mantener la temperatura y la presión del paso c) durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 11 a aproximadamente 13 horas;
- e) aumentar la temperatura del estante liofilizador del paso d) a una temperatura de secado secundaria de aproximadamente 25°C y disminuir la presión a menos de aproximadamente 50 μBar durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 60 a aproximadamente 90 minutos; y
- f) mantener la temperatura y presión del paso e) a la temperatura de secado secundaria y la presión durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 11 horas;

en donde los pasos a) y b) se llevan a cabo opcionalmente a presión atmosférica; en donde el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

18. Una solución acuosa de trombina que comprende:

- de aproximadamente el 1 a menos de aproximadamente el 4,6% (p/v) de sacárido o alcohol de azúcar; por lo menos de aproximadamente el 0,7 a menos de aproximadamente el 1,75% (p/v) de cloruro de sodio; de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 3% (p/v) de albúmina;
- de aproximadamente el 200 a aproximadamente el 2000 UI/ml de trombina;
- de aproximadamente el 0,3 a aproximadamente el 1,5% (p/v) de cloruro de calcio; y
- de aproximadamente el 0,14 a aproximadamente el 1% (p/v) de acetato de sodio;
- en donde la solución acuosa de trombina carece de polietilenglicol;
- en donde el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

18. La solución acuosa de trombina de la reivindicación 17, en donde la solución acuosa de trombina es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8.

19. La solución acuosa de trombina de la reivindicación 17 o la reivindicación 18, que tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 9;

en donde el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

20. Una composición de trombina sólida obtenible de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

21. La composición sólida de cualquiera de la reivindicación 20, que comprende de aproximadamente el 19,5% a aproximadamente el 78% (p/p de la composición total) de manitol, de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 20% (p/p de la composición total) de acetato de sodio; de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 53% (p/p de la composición total) de albúmina; de aproximadamente el 2,5% a aproximadamente el 31% (p/p de la composición total) de cloruro de calcio; y de aproximadamente el 6% a aproximadamente el 45% (p/p de la composición total) de cloruro de sodio; y que comprende preferiblemente de aproximadamente el 22% a aproximadamente el 66% (p/p de la composición total) de manitol, de aproximadamente el 1,5% a aproximadamente el 10% (p/p de la composición total) de acetato de sodio; de aproximadamente el 2,5% a aproximadamente el 43% (p/p de la composición total) de albúmina; de aproximadamente el 4% a aproximadamente el 17% (p/p de la composición total) de cloruro de calcio; y de aproximadamente el 9,5% a aproximadamente el 25% (p/p de la composición total) de cloruro de sodio; en donde el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.



Fig. 1