

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 969**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)

C12Q 1/56 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2012 PCT/IT2012/000193**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13190582**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2012 E 12756826 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **25.11.2020 EP 2864496**

54 Título: **Método basado en euglobulina para determinar la actividad biológica de defibrotida**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
03.09.2021

73 Titular/es:

**GENTIUM S.R.L. (100.0%)
Piazza XX Settembre 2
22079 Villa Guardia (Como), IT**

72 Inventor/es:

**IGNONI, TERENCE;
KUMAR, VIJAY y
ISLAM, KHALID**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

DESCRIPCIÓN

Método basado en euglobulina para determinar la actividad biológica de defibrinada

5 La presente invención se refiere a un método para determinar la actividad biológica de defibrinada y, en particular, se refiere a un método enzimático indirecto para determinar la actividad biológica de defibrinada.

Campo técnico de la invención

10 La defibrinada (Merck Index, 1996, n.º 2915) es una sustancia de origen natural que se obtiene por extracción a partir de órganos animales y que está constituida por la sal de sodio de polidesoxirribonucleótidos que tienen un bajo peso molecular. La defibrinada ha sido objeto de numerosas investigaciones farmacológicas que han sugerido que se aplique en terapia como un agente antitrombótico (patente de Estados Unidos N.º 3.829.567).

15 Además, también se ha usado defibrinada con éxito en el tratamiento de arteriopatías periféricas, en insuficiencia renal aguda (patente de Estados Unidos N.º 4.694.134) o en isquemia miocárdica aguda (patente de Estados Unidos N.º 4.693.995).

20 La defibrinada está actualmente en proceso de ensayos clínicos para usarse para el tratamiento y prevención de la enfermedad venooclusiva (VOD).

25 Al igual que otras sustancias biológicas que se obtienen por extracción, la defibrinada también está sujeta a una variabilidad de composición limitada que es típica de biopolímeros naturales. Un ejemplo clásico de esta situación lo proporciona la heparina, cuya variabilidad de lote a lote en términos de longitud de cadena, peso molecular, composición, grado de sulfatación, etc., se conoce bien. La consecuencia de esto es que las mismas cantidades en peso de defibrinada pueden, de hecho, ser no equivalentes desde el punto de vista de una actividad biológica específica.

30 El proceso de extracción, aislamiento y purificación no pueden garantizar per se una reproducibilidad absoluta del producto, precisamente debido a su naturaleza biopolimérica intrínseca.

35 Sin embargo, si se controla bien, es posible reducir esta variabilidad: para ese propósito, se han realizado estudios de procesos industriales estandarizados para aislar defibrinada por extracción a partir de órganos, tal como, por ejemplo, los descritos en la patente de Estados Unidos N.º 4.985.552.

40 El producto obtenido de acuerdo con el proceso anteriormente mencionado se caracteriza por la determinación de algunos parámetros fisicoquímicos específicos, tal como, por ejemplo, movilidad electroforética, el coeficiente de extinción, potencia rotatoria óptica y promedio en masa de masa molecular relativa. Sin embargo, esos parámetros dependen básicamente de la estructura de la defibrinada y no son capaces de proporcionar información de la actividad biológica de la misma.

45 Hasta donde alcanza el conocimiento de los presentes inventores, los únicos métodos que se ha informado para usarse, hasta ahora, para evaluar la actividad biológica de la defibrinada son la prueba de placa de fibrina y el registro tromboelastográfico del tiempo de lisis de euglobulina [Prino G., Mantovani M., Niada R., Coccheri S., Butti A., Indagini preliminari sull'attività fibrinolitica, nell'animale e nell'uomo, di una nuova sostanza presente in diversi organi animali, Simposio Internazionale: La ricerca scientifica nell'industria farmaceutica in Italia, Rome, 2-4 Oct. 1975-II Farmaco, Ed. Prat.) (1969), 24,552-561] y el método basado en plasmina divulgado en la patente de Estados Unidos N.º 7.338.777.

50 Sin embargo, el método anteriormente mencionado de registro tromboelastográfico del tiempo de lisis de euglobulina se caracteriza por una considerable complejidad experimental, por reproducibilidad y precisión poco satisfactorias y en el caso específico del registro tromboelastográfico, por una linealidad de respuesta limitada para unos intervalos de concentración muy restrictivos.

55 En cuanto al método basado en plasmina, la actividad enzimática de la plasmina normalmente se determina por varias pruebas estándar in vitro. Uno de los métodos más comúnmente utilizados es la determinación por espectrofotometría o fluorimetría de los compuestos cromogénicos o fluorogénicos que se liberan por la acción de plasmina en sustratos adecuados [Haemostasis, (1978), 7, 138-145]. Generalmente, se utilizan sustratos peptídicos que tienen la fórmula A₁-A₂-A₃-X, en los que A₁ y A₂ son aminoácidos que son predominantemente no polares, A₃ es lisina o arginina y X representa el compuesto medible liberado, por ejemplo para-nitroanilina (pNa) o 2-naftilamina (NA) [Haemostasis, (1978), 7, 146-149]. Además de los sustratos peptídicos anteriormente mencionados, el éxito se logra usando otros compuestos más simples, tal como, por ejemplo, p-nitrobencil-p-toluenosulfonil-L-arginina [Haemostasis, (1978), 7, 105-108].

65

La tasa a la que se libera el compuesto X en el medio de incubación es proporcional a la actividad (unidades/mg) de plasmina presente en la muestra. El método que se divulga en la patente de Estados Unidos N.º 7.338.777 se basa, por tanto, en el hallazgo de que, en las pruebas de evaluación de plasmina descritas anteriormente, la defibrotida aumenta la tasa de liberación del compuesto X proporcionalmente a su concentración.

Sin embargo, dicho método se realiza en tampón TRIS sin ningún otro activador/inhibidor de plasma/suero. Por lo tanto, el procedimiento no refleja la condición fisiológica ni simula con precisión el mecanismo de acción de defibrotida *in vivo*.

Hasta el momento, por lo tanto, se han descrito y validado métodos no verdaderamente válidos, precisos y reproducibles para determinar la actividad biológica de defibrotida que reflejan de una manera precisa el mecanismo de acción del producto en un sistema biológico complejo (*in vivo*).

Se ha desarrollado un método simple y fiable para determinar la actividad biológica de defibrotida, que permite controlar las muestras obtenidas por extracción y por lo tanto, permite estandarizar las preparaciones medicinales basadas en defibrotida.

El método al que se refiere la presente invención permite determinar la actividad biológica específica de la defibrotida en comparación con un patrón de referencia con un alto grado de precisión y exactitud.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un gráfico que muestra la cinética de liberación de pNA del sustrato S-2251, por medio de una fracción de euglobulina de mamífero que está activada y no activada con defibrotida (concentración 0-50 µg/ml, 0-100 min).

La FIG. 2 es un gráfico que ilustra el sigmoide que surge en relación con un patrón y una muestra de prueba de defibrotida.

La FIG. 3 es un gráfico que muestra la "absorbancia frente al tiempo" de preparaciones patrón (por ejemplo: S1_Ca, S1_Cb, S1_Cc) e identifica un intervalo lineal adecuado (por ejemplo: de 30 a 35 min).

Descripción de la invención

La presente invención, por lo tanto, se refiere a un método para determinar la actividad biológica específica de muestras de defibrotida, método que comprende las etapas de:

a) poner en contacto defibrotida, euglobulina y un sustrato específico para la plasmina que, por reacción con la plasmina, proporciona un producto medible y

b) medir la cantidad de producto formado en sucesivas ocasiones.

El método de la invención es un método indirecto *in vitro* para determinar la actividad de defibrotida, que se basa en las interacciones funcionales entre la defibrotida y la euglobulina.

La euglobulina es la fracción de globulina sérica que es insoluble en agua destilada pero soluble en soluciones salinas.

La euglobulina contiene fibrinógeno, PAI-1, activador del plasminógeno tisular (tPA), plasminógeno y, en menor medida, alfa 2-antiplasmina y también factor VIII.

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la defibrotida cataliza la hidrólisis del plasminógeno en plasmina. Por consiguiente, cuando la defibrotida se incuba con euglobulina y un sustrato específico para plasmina, tal como un péptido de fórmula A₁-A₂-A₃-X como se divulga por Haemostasis, (1978), 7, 138-149, la tasa a la que se libera el compuesto X en el medio de incubación aumenta proporcionalmente a la concentración de defibrotida en el mismo.

En otros términos, la defibrotida cataliza la hidrólisis del plasminógeno contenido en euglobulina en plasmina; plasmina que reacciona enzimáticamente con el sustrato específico para plasmina, preferentemente un sustrato cromogénico, para proporcionar un producto medible.

El método de la presente invención comprende adicionalmente las etapas de: c) determinar la tasa de liberación del producto medible durante el transcurso de la reacción enzimática de una muestra patrón y una muestra de prueba de defibrotida; d) correlacionar, matemáticamente y/o gráficamente, la tasa de liberación con la concentración de defibrotida correspondiente para obtener la actividad biológica de la muestra de prueba de defibrotida.

La muestra de defibrótida utilizada para la determinación de acuerdo con la presente invención se prepara generalmente por extracción a partir de órganos de acuerdo con procedimientos conocidos, tal y como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 4.985.552 que ya se ha mencionado.

5 Se eligió un lote de defibrótida normal fabricado industrialmente como muestra de referencia (patrón) y se usó para preparar las curvas de calibración de acuerdo con el método de la presente invención.

10 En general, el presente método proporciona medidas precisas y exactas de defibrótida incluso en presencia de contaminantes, tal como, por ejemplo, ARN, heparina, defibrótida degradada (defibrótida de la que se ha eliminado purina o pirimidina) o etanol, siempre que estén en concentraciones, generalmente menores del 10% en peso, para no perjudicar el sistema.

15 Además de permitir la determinación de defibrótida, el método también permite la determinación de otras sustancias biológicamente equivalentes derivadas de defibrótida, tal como, por ejemplo, defibrótida desaminada o, más simple, defibrótida desnaturalizada/degradada por combinación de condiciones fisicoquímicas.

20 El presente método es suficientemente sensible para detectar concentraciones de defibrótida inferiores o iguales a 2,5 µg/ml (concentración final en el sistema de determinación) y, en general, expresa buena correlación hasta valores de concentración máxima superiores o iguales a 1000 µg/ml.

La euglobulina utilizada es generalmente cualquier fracción de euglobulina de mamífero, tal como, por ejemplo, euglobulina bovina, porcina, de conejo y humana, con preferencia por euglobulina humana o bovina.

25 Sin embargo, aunque la fracción de euglobulina es el sistema enzimático de elección, el uso de otros sistemas enzimáticos equivalentes, tal como, por ejemplo, plasma y suero diluidos (hasta 1:10 con tampones), combinaciones de plasminógeno artificialmente creadas o aisladas, tPA, uPA, PAI-1&2 alfa 2 antiplasmina y los sistemas enzimáticos similares que están químicamente y biológicamente relacionados y tienen una funcionalidad similar, están dentro del alcance de la presente invención.

30 En el método de la presente invención, el sustrato para la plasmina puede entenderse como cualquier sustrato específico para plasmina que, en las condiciones del método, libera un producto de hidrólisis detectable X.

35 Dependiendo de la naturaleza del grupo detectable X, se pueden adoptar, igualmente bien, sistemas de detección alternativos comúnmente conocidos por el experto en la materia. Los sistemas de detección espectrofotométrica y fluorimétrica son particularmente ventajosos, especialmente los sistemas espectrofotométricos.

40 Los sustratos utilizados generalmente son aquellos que son específicos para ensayos de plasminógeno plasmina. Es preferible usar péptidos de la fórmula A₁A₂-A₃-X, en los que A₁ y A₂ son aminoácidos que son predominantemente no polares, A₃ es lisina o arginina y X es el grupo detectable. Son ejemplos de esos sustratos Val-Leu-Lys-pNa, Val-Phe-Lys-pNa o piroGlu-Phe-Lys-pNa en los que el grupo X detectable por espectrofotometría es para-nitroanilina (pNA). Otros sustratos adecuados, por ejemplo Val-Gly-Arg-2NA, contiene 2-naftilamina, que es medible por fluorimetría. Un sustrato particularmente preferido es el compuesto H-D-Valil-L-Leucil-L-Lisina-p35 nitroanilina (H-D-Val-Leu-Lys-pNA).

45 Los sustratos específicos utilizados para determinar la actividad de defibrótida en la fracción de euglobulina están disponibles comercialmente.

50 El método de determinación de la presente invención se lleva a cabo colocando una muestra de defibrótida en una solución de euglobulina, en un pH y molaridad específicos.

55 En particular, las fracciones de euglobulina obtenidas del plasma de mamífero se reconstituyen disolviendo y diluyendo la euglobulina al volumen original del plasma generador con tampón salino (por ejemplo: la cantidad de fracción de euglobulina obtenida de 10 ml de plasma se disuelve y reconstituye a 10 ml con tampón salino a Ph entre 7 y 8).

60 Sin embargo, con respecto a las concentraciones de sustratos, generalmente se usan de 0,3 a 4 mM, preferentemente de 2,5 a 3,5 mM y ventajosamente de 3 mM en el caso de un sustrato cromogénico, mientras que se usan concentraciones de 0,05 a 0,15 mM en el caso de un sustrato fluorogénico.

El método de determinación de la invención, como otros métodos enzimáticos, es sensible al pH del medio.

65 De hecho, no se puede aplicar generalmente en valores de pH extremos donde el sistema enzimático se inactivaría.

También es preferible que el pH del medio no experimente variación en ningún momento durante el período en que se toman las medidas, y por lo tanto, la fracción de euglobulina se reconstituye con sistemas tampón seleccionados de los que normalmente se usan para las pruebas biológicas. Sistemas de tampón adecuados pueden ser, por ejemplo, tampón fosfato, tampón citrato o tris(hidroximetil)aminometano clorhidrato y tampón cloruro de sodio (TRISNaCl). La reconstitución de la fracción de euglobulina se lleva a cabo preferentemente con TRIS NaCl.

En el presente método, se prefiere mantener habitualmente el pH del medio en un intervalo de aproximadamente de 7 a 8, más preferentemente aproximadamente 7,4-7,6.

Además, se prefiere mantener la concentración del sistema tampón en un intervalo de 10 a 200 mM, preferentemente aproximadamente 50 mM. Más específicamente, para TRIS-NaCl las concentraciones deben ser 50 mM para TRIS y 150 mM para cloruro de sodio

El método de la invención para determinar la actividad biológica de defibrotida, las soluciones de muestra de defibrotida se diluyen directamente en fracción de euglobulina, y luego se añade el sustrato cromogénico y fluorogénico. En particular, para permitir las mediciones, es preferible diluir/disolver defibrotida previamente en tampón TRIS-NaCl para obtener una solución madre de ambos, muestra y patrón. A partir de las soluciones madre se diluyen la muestra y el patrón, por diluciones en serie, en un volumen definido de fracción de euglobulina hasta el intervalo de concentración analítica que es de 1 a 1000 µg/ml de defibrotida

Un parámetro importante en el presente método de determinación es la temperatura. Es preferible mantener la misma temperatura durante toda la duración de las mediciones y para todas las muestras determinadas, tanto en lo que respecta a la construcción de las curvas de referencia como durante la etapa de medición. Con ese fin, es preferible usar un aparato de temperatura controlada y también, cuando sea necesario, es posible continuar con varios conjuntos de mediciones, cambiando la posición de las muestras adecuadamente para asegurar que el sistema tiene una máxima homogeneidad térmica.

En general, este método de determinación se aplica en un intervalo de temperatura de, por ejemplo, desde 25 a 40 °C, preferentemente de 35 a 39 °C, y aún más preferentemente a 37 °C.

Según la presente invención, la medición de la concentración de compuesto X liberado en el medio por la acción de defibrotida comienza cuando se han añadido todos los reactivos y continúa durante un tiempo predeterminado y a una frecuencia predeterminada en función de la naturaleza química de X y del sistema de detección.

De manera similar a otros métodos de determinación biológica, el método de la invención también proporciona una etapa de calibración y una etapa de medición que se llevan a cabo preferentemente en la misma microplaca para reducir lo más posible la incidencia de la variabilidad experimental.

La etapa de calibración comprende la adquisición de los datos de absorbancia relativos a las muestras a concentraciones crecientes conocidas de defibrotida (patrón), el reprocesamiento estadístico de esos datos y la extrapolación de las curvas de calibración, que expresan la correlación entre el incremento en la velocidad de la reacción enzimática de la invención y la concentración de defibrotida presente en la fracción de euglobulina. En la etapa de medición, debido a la correlación obtenida en la etapa de calibración, es posible determinar las actividades biológicas desconocidas de las muestras de defibrotida basándose en los valores de absorbancia medidos y procesados en las mismas condiciones.

Con más detalle, el protocolo experimental generalmente proporciona la preparación de varias muestras, tanto patrón como desconocida, a varias concentraciones conocidas de defibrotida. Las muestras de defibrotida se preparan por dilución progresiva de las soluciones madre de acuerdo con un factor de dilución predeterminado.

En el presente método, se prefiere preparar, al menos, 5 concentraciones de patrón y 5 concentraciones de la muestra a analizar, preparando, al menos, 4 réplicas para cada concentración del patrón y de manera similar, para cada concentración de la muestra de prueba, generalmente para diluciones sucesivas 1:2 de soluciones madre.

Tanto las concentraciones del patrón como de la muestra de prueba de defibrotida son generalmente de 0,1 a 1000 µg/ml.

Las concentraciones de la muestra de prueba son preferentemente del mismo orden de magnitud que las concentraciones del patrón.

De acuerdo con la ilustración anterior, las mediciones de cada concentración se llevan a cabo preferentemente en 1 microplaca donde preferentemente se alterna la posición de cada muestra, el patrón y la muestra de prueba, respectivamente, en la concentración correspondiente. De acuerdo con este esquema para la

disposición de las muestras, que se explica con más detalle en la parte experimental, para cada concentración de defibrotida tanto del patrón como de la muestra de prueba, se miden, al menos, 4 valores de absorbancia para cada tiempo.

5 El conjunto de mediciones descritas anteriormente se toman en tiempos predeterminados, es decir, en primer lugar a tiempo 0, es decir, cuando se hayan añadido todos los componentes, antes de que haya comenzado la reacción enzimática de la invención y, posteriormente, a intervalos precisos y durante un periodo de tiempo suficiente para adquirir los datos necesarios.

10 Preferentemente, las mediciones de la absorbancia se continúan hasta un máximo de 90 minutos, con lecturas tomadas cada 1-10 minutos. Más ventajosamente, las lecturas se toman cada minuto. Las lecturas de absorbancia fotométrica se realizan a una longitud de onda que depende de la naturaleza del grupo X detectable liberado en el curso de la reacción hidrolítica enzimática. En el caso específico en el que X es p-NA, la absorbancia se mide a 405 nm.

15 Las lecturas de absorbancia de las muestras de defibrotida del patrón y desconocida, conocidas como datos sin procesar, generalmente se originan directamente del mismo aparato que proporciona la operación de lectura; se tabulan de tal manera que se expresa un valor de absorbancia para cada tiempo y pocillo.

20 Los datos sin procesar se procesan luego, utilizando, por ejemplo, la hoja de cálculo-Microsoft Excel®. Esta primera operación de procesamiento conduce al cálculo de la absorbancia promedio y de la desviación típica asociada, en cada momento y para cada conjunto de lecturas, cada conjunto comprende, al menos, 4 réplicas para cada concentración de defibrotida, tanto del patrón como de la muestra de prueba.

25 El procesamiento estadístico adicional de los datos se lleva a cabo con software disponible comercialmente para determinación de ensayos biológicos como se describe por Finney D J, *Statistical Method in Biological Assay*, 2nd ed. Ch. Griffin, London and relevant Pharmacopoeias.

30 Para ser más precisos, de acuerdo con la presente invención, la determinación de ensayo biológico de defibrotida se puede realizar usando un modelo de línea paralela, modelo de relación de pendiente y modelos de curva logística de cuatro parámetros como se define, por ejemplo, por el texto general relevante de la Farmacopea Europea 5.3, *Análisis Estadístico*"

35 Como se ilustra en la FIG. 1, al colocar el tiempo en las abscisas y la absorbancia en las ordenadas, se obtendrán líneas rectas cuya pendiente "b" será proporcional a la velocidad de reacción enzimática: al incrementar la concentración de defibrotida, aumentarán la velocidad de hidrólisis y, proporcionalmente, el valor de "b". Finalmente, los valores de pendiente, calculados como se describe anteriormente para cada conjunto de réplicas de defibrotida de patrón y defibrotida de muestra de prueba, se correlacionan con la concentración de defibrotida a la que se refieren. Se puede utilizar la transformación matemática adecuada de las abscisas (es decir, logaritmo de concentración de defibrotida) en lugar del valor real.

40 Gráficamente, esa correlación da lugar a un sigmoide para el patrón y un sigmoide para la muestra de prueba (FIG. 2); las porciones centrales del sigmoide tienen dos líneas rectas que son generalmente paralelas y la distancia entre ellas es una función de la diferencia en la actividad biológica entre la muestra de prueba y el patrón. Este intervalo se utiliza para la determinación de la potencia usando el modelo de líneas paralelas como se describe por Finney D J, *Statistical Method in Biological Assay*, 2nd ed. Ch. Griffin, London.

45 Para una determinación más específica, se utilizan los modelos de curva logística de cuatro parámetros y en este caso se usa toda la curva sigmoidea de ambas, muestra y patrón, para el cálculo de la potencia biológica relativa de la muestra.

50 En una realización preferida de la presente invención, las soluciones de patrón y las soluciones de las muestras de defibrotida a determinar se introducen en los pocillos respectivos de la microplaca. Las fracciones de euglobulina se preparan en el momento de usarse y es el medio de dilución de la solución madre de defibrotida. Finalmente, se añade la solución que contiene el sustrato cromogénico. La microplaca se coloca luego en un lector termostático y, después de agitación rápida, se toman las lecturas de absorbancia del sistema en intervalos predeterminados y durante el periodo de tiempo predeterminado. Los datos sin procesar obtenidos se procesan luego, determinando así las actividades desconocidas de las muestras de defibrotida.

55 Como se apreciará en los siguientes ejemplos, el método de acuerdo con la presente invención permite obtener formulaciones líquidas de defibrotida, preferentemente soluciones de agua, que tienen una actividad biológica definida y, en particular, que tienen una actividad de 25 a 35 UI/mg de defibrotida, preferentemente de 27,5 a 32,5 UI/mg y, más preferentemente, de 28 a 32 UI/mg.

65

Las formulaciones líquidas de defibrotida se comercializan preferentemente en forma de recipientes, más preferentemente en viales, que contienen 200 mg de defibrotida en 2,5 ml solución de agua tamponada (preferentemente a un pH de 6,5 a 8,5, más preferentemente de 7 a 8) para diluirla antes de usar; en consecuencia, cuando se evalúa la actividad biológica con el método de la presente invención, cada recipiente presenta una actividad de defibrotida de 5000 a 7000 UI, preferentemente de 5500 a 6500 IU, más preferentemente de 5600 a 6400.

Esos y otros aspectos de la invención se ilustrarán mejor en los siguientes ejemplos que, sin embargo, no deben considerarse como limitantes de la invención.

Ejemplos

Los siguientes materiales se usaron en los ejemplos dados aquí:

Aparato

Principales características:	Lector de microplaca para la determinación de absorbancia UV-Vis equipado con cámara termostática y filtro de absorbancia de 405 nm.		
Detección	Determinación de Absorbancia Cinética a 405 nm		
Tipo de Placa	Transparente de 96 pocillos para determinación UV-Vis		
Temperatura de la Cámara	37°C	Tiempo Total de grabación de Absorbancia.	45-60 min
Frecuencia de grabación de Absorbancia	Alrededor de 1 x minuto		

Programas y Software

- Microsoft Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, Wash., USA)

Sustancias

- Defibrotida (Gentium)
- Sustrato cromogénico S-2251 (Chromogenix Instrumentation Laboratory S.p.A., Milan, Italy)
- Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)-NaCl, (Sigma-Aldrich, Milan, Italy)
- HCl 1 N (Carlo Erba reagenti, Milan, Italy)
- NaOH 1 N (Carlo Erba reagenti, Milan, Italy)
- Plasma bobino (Tebu Bio Italia, Magenta (MI), Italy)
- Ácido Acético Glacial (Carlo Erba reagenti, Milan, Italy)

Soluciones

- TRIS-NaCl (Preparación de 1 l): Transferir cuantitativamente en un vaso de precipitados de 1 l 6,06 g de TRIS NaCl-HCl y 2,2 g de NaCl. Disolver en 500 ml de agua purificada y ajustar el pH a 7,4 con aproximadamente 40 ml de HCl 1 N. Transferir cuantitativamente la solución a un matraz volumétrico de 1 l y enrasar la solución con agua purificada. Almacenar la solución en el refrigerador (2-8 °C)
- Sustrato cromogénico S2251 (CAS 63589-93-5) 3 mM Preparación de (15,2 ml): Disolver aproximadamente 25 mg de sustrato cromogénico con 15,2 ml de agua purificada. Almacenar la solución en el refrigerador (2-8 °C)
- Euglobulinas Bovinas (Preparación de 10 ml). Introducir 240 ml de agua purificada enfriada con hielo en un envase con una capacidad mínima de 300 ml y agregar 10 ml de plasma bovino bajo agitación. Ajustar el pH a 5,3 ± 0,1 con ácido acético 1 %. Dejar reposar a 2-8 °C durante 1 a 16 horas. Eliminar la solución sobrenadante transparente mediante sifón y recoger el precipitado mediante centrifugación a 2.800 rpm durante 5 minutos y a 4 °C. Suspender el precipitado dispersándolo mecánicamente (por ejemplo, por medio de una varilla de vidrio de laboratorio) en 5 ml de agua purificada enfriada con hielo, agitar durante aproximadamente 5 min y recoger el precipitado por centrifugación a 2.800 rpm durante 5 minutos y a 4 °C. Dispersar el precipitado mecánicamente en aproximadamente 10 ml de TRIS-NaCl; para facilitar la disolución del precipitado, aplastar las partículas del precipitado con un instrumento adecuado (por ejemplo: una varilla de vidrio de laboratorio). Almacenar la suspensión obtenida a 2-8 °C durante no menos de 1 hora y no más de 6 horas antes de su uso.

Soluciones de Defibrotida de Patrón y Muestra

Solución Madre de Referencia

5 Transferir cuantitativamente, en un matraz volumétrico de 20 ml, aproximadamente 100 mg de patrón de referencia de defibrotida pesado con precisión. Disolver el polvo con aproximadamente 10 ml de TRIS-NaCl y enrasar con el mismo disolvente. Diluir la solución obtenida a 1:4 con TRIS-NaCl para obtener una solución RS de defibrotida de aproximadamente 1,25 mg/ml.

10 Solución Madre de Muestra

15 Transferir cuantitativamente, en un matraz volumétrico de 20 ml, aproximadamente 100 mg de muestra de defibrotida pesados con precisión. Disolver el polvo con aproximadamente 10 ml de TRIS-NaCl y enrasar con el mismo disolvente. Diluir la solución obtenida 1:4 con TRIS-NaCl para obtener una solución de muestra de defibrotida de aproximadamente 1,25 mg/ml.

Preparación de las soluciones de referencia y muestra

20 a) Defibrotida 125 ug/ml: Diluir la solución madre de defibrotida 1:10 (Referencia y Muestra) con TRIS NaCl (que corresponde a 50 ug/ml en el pocillo de la placa). Transferir cuantitativamente 500 ul de la solución preparada a un tubo eppendorf y mezclar con 500 ul de euglobulina. Cerrar el tubo y almacenar en agua enfriada con hielo.

25 b) Defibrotida 62,5 ug/ml: diluir la solución 1:2 (a) con TRIS NaCl (correspondiente a 25 ug/ml en un pocillo de la placa). Transferir cuantitativamente 500 ul de la solución preparada a un tubo eppendorf y mezclar con 500 ul de euglobulina. Cerrar el tubo y almacenar en agua enfriada con hielo.

30 c) Defibrotida 31,25 ug/ml: diluir la solución (b) 1:2 con TRIS NaCl (que corresponde a 12,5 ug/ml en el pocillo de la placa). Transferir cuantitativamente 500 ul de la solución preparada a un tubo eppendorf y mezclar con 500 ul de euglobulina. Cerrar el tubo y almacenar en agua enfriada con hielo.

30 d) Defibrotida 12,5 ug/ml: diluir la solución 1:2,5 (d) con TRIS NaCl (que corresponde a 5 ug/ml en el pocillo de la placa). Transferir cuantitativamente 500 ul de la solución preparada a un tubo eppendorf y mezclar con 500 ul de euglobulina. Cerrar el tubo y almacenar en agua enfriada con hielo.

Solución blanco

35 Mezclar 1 volumen de euglobulinas con 1 volumen de solución de TRIS NaCl (por ejemplo: 500 ul + 500 ul)

Deposición en Placa

40 De acuerdo con el esquema de deposición propuesto (véase la Tabla 1 presentada a continuación), añadir 200 ul de solución patrón o muestra o blanco en cada pocillo de la placa. Debe tenerse en cuenta que se puede usar un esquema deposición según la disponibilidad y configuración de las pipetas automáticas. Sin embargo se deben usar no menos de 4 deposiciones por cada solución referencia y muestra para el ensayo.

45 Añadir en cada pocillo 50 ul de sustrato Cromogénico inmediatamente antes de la incubación de la placa en el lector de microplacas.

Tabla 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
50	A	-	BLK	S1_Ca	S1_Cb	S1_Cc	S1_Cd	-	-	-	-	-
	B	-	BLK	S2_Ca	S2_Cb	S2_Cc	S2_Cd	-	-	-	-	-
	C	-	BLK	S3_Ca	S3_Cb	S3_Cc	S3_Cd	-	-	-	-	-
55	D	-	BLK	S4_Ca	S4_Cb	S4_Cc	S4_Cd	-	-	-	-	-
	E	-	BLK	U1_Ca	U1_Cb	U1_Cc	U1_Cd	-	-	-	-	-
	F	-	BLK	U2_Ca	U2_Cb	U2_Cc	U2_Cd	-	-	-	-	-
	G	-	BLK	U3_Ca	U3_Cb	U3_Cc	U3_Cd	-	-	-	-	-
60	H	-	BLK	U4_Ca	U4_Cb	U4_Cc	U4_Cd	-	-	-	-	-
65	S1, S2, S3, S4: deposición 1 de la Solución de Referencia, deposición 2, deposición 3, deposición 4, U1, U2, U2, U5: deposición 1 de la solución Muestra, deposición 2, deposición 3, deposición 4, Ca, Cb, Cc etc.: Concentración de defibrotida de referencia y muestra a, b, c, etc.											

BLK solución Blanco

Cálculos y resultados

5 A partir de la gráfica cinética “absorbancia frente al tiempo” de las preparaciones patrón (por ejemplo: S1_Ca, S1_Cb, S1_Cc) e identifica un intervalo lineal adecuado (por ejemplo: de 30 a 35 min, véase la figura 3). Identificación del intervalo cinético lineal (A a 405 nm frente al tiempo).

10 Calcular para cada preparación del patrón y de la muestra, la respuesta del ensayo (Pendiente) en el intervalo de tiempo predefinido como sigue.

$$\text{Respuesta de la Muestra y del Patrón} = \frac{A_b - A_a}{T_b - T_a} \times 1000$$

Donde:

15 Aa es el valor de Absorbancia en el tiempo Ta (30 min de la gráfica anterior)
 Ab es el valor de Absorbancia en el tiempo Tb (35 min de la gráfica anterior)

Presentar el valor obtenido en un formato de tabla como se presenta en la tabla 2.

Tabla 2

Nivel de Concentración [ug/ml]	Preparación Patrón				Preparación Muestra			
	S1	S2	S3	S4	U1	U2	U3	U4
5	S1_Cd	S2_Cd	S3_Cd	S4_Cd	U1_Cd	U2_Cd	U3_Cd	U4_Cd
12,5	S1_Cc	S2_Cc	S3_Cc	S4_Cc	U1_Cc	U2_Cc	U3_Cc	U4_Cc
25	S1_Cb	S2_Cb	S3_Cb	S4_Cb	U1_Cb	U2_Cb	U3_Cb	U4_Cb
50	S1_Ca	S2_Ca	S3_Ca	S4_Ca	U1_Ca	U2_Ca	U3_Ca	U4_Ca

35 Representar las respuestas para la sustancia a examinar y para el patrón frente al logaritmo de la concentración y calcular la actividad de la sustancia a examinar usando el modelo de líneas paralelas como se define en el capítulo pertinente 5.3.2 de la edición actual de la Ph. Eur.

40 Se deben usar no menos de 3 diluciones en serie consecutivas de la referencia y de la muestra (por ejemplo, concentración de defibrótida 5 ug/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml o 5 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml o 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 mg/ml).

Análisis de la varianza

45 El análisis de la varianza se lleva a cabo de acuerdo con la sección 5.3.2.3 de la edición actual de la Ph. Eur. Y Finney DJ (1964) Statistical Method in Biological Assay 2nd ed.

Prueba de Validez

- 50 1) Los términos de regresión lineal son significativos, es decir, la probabilidad calculada es menor que 0,05. Si no se cumple este criterio, no es posible calcular el I.C. del 95 %.
- 2) La expresión de no paralelismo no es significativa, es decir, la probabilidad calculada es menor que 0,05.
- 3) La expresión de no linealidad no es significativa, es decir, la probabilidad calculada es menor que 0,05.

Criterios de aceptación

- 55 4) La potencia estimada no es inferior al 90 % ni superior al 111 % de la potencia establecida.
- 60 5) Los límites de confianza (P=0,95) de la potencia estimada no son inferiores al 80 % ni superiores al 125 % de la potencia establecida

Cálculos

$$\text{Potencia de la muestra (UI/mg)} = \frac{\text{Rx Potencia Std (UI/mg) x ConcStd (mg/ml)}}{\text{Conc. Muestra (mg/ml)}}$$

donde:

- 5
- R: Resultado de la muestra obtenida por análisis de modelo de líneas paralelas
 - Potencia Std: Potencia establecida del Patrón (UI/mg en sustancia seca)
 - Conc. Std: Concentración del Patrón (mg/ml en sustancia seca)
 - Conc. Muestra: Concentración de la Muestra (mg/ml en sustancia seca)

10 Ensayo aplicado a formulaciones de defibrotida

El ensayo divulgado anteriormente se ha usado para determinar la actividad biológica de formulaciones líquidas que contienen 200 mg de defibrotida en 2,5 ml (80 mg por ml) y que tienen la composición cuali-cuantitativa presentada en la tabla 3.

15 **Tabla 3**

Componente	Referencia a la Calidad del Patrón	Función	200 mg de Inyección	Concentración por ml
Defibrotida	Patrón Interno	Fármaco	200,00 mg	80,00 mg
Citrato sódico, Dihidrato	USP-EP	Tampón	25,00 mg	10,00 mg
Agua para inyección	USP-EP	Disolvente/medio	c.s. hasta 2.5 ml	1,00 ml
Hidróxido de sodio 1 M y ácido clorhídrico 1 M	NF - EP	ajuste de pH	c.s. hasta 6,8-7,8	-
Nitrógeno	NF - EP	Insertar gas para desplazar el aire	c.s.	-

Los resultados se presentan en la Tabla 4.

35 **Tabla 4**

Lote	Potencia UI/mg	Potencia UI/envase de 200 mg
688	31	6200
738	34	6800
785	32	6400
836	30	6000
0406	31	6200
DS0617	35	7000
DV0502*	*	Not available
DV0601	35	7000
10700 10073	32	6400
10800 10016	32	6400
1080020018	31	6200
1080030021	31	6200
1080040110	32	6400
1080050114	35	7000
1080060117	34	6800
Mean	33	
Min	30	
Max	35	
RSD (%)	5,4	

*Utilizado como patrón de referencia

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la actividad biológica de defibrotida, que comprende las etapas de:
- 5 a) poner en contacto defibrotida, euglobulina de mamífero y un sustrato específico para la plasmina que, por reacción con la plasmina, proporciona un producto medible; y
- b) medir la cantidad de producto formado en sucesivas ocasiones, para, así, determinar la actividad biológica de defibrotida.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la euglobulina es una euglobulina de mamífero.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la euglobulina es euglobulina humana, de conejo o bovina.
- 15 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la plasmina que reacciona con el sustrato específico para la plasmina se libera mediante el plasminógeno contenido en la euglobulina.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sustrato específico para la plasmina es un sustrato cromogénico.
- 20 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sustrato específico para la plasmina es un compuesto de fórmula $A_1-A_2-A_3-X$ en el que A_1 y A_2 son aminoácidos no polares, A_3 es lisina o arginina y X es el grupo medible.
- 25 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el producto medible X se selecciona del grupo que consiste en paranitroanilina y 2-naftilamina.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el sustrato específico para plasmina es H-D-Valil-L-Leucil-L-Lisina-p-nitroanilina.
- 30 9. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde el producto medible X se mide por espectrofotometría o espectrofluorimetría.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la euglobulina de mamífero se reconstituye en el mismo volumen del plasma de origen o se diluye hasta 1:10 con tampón adecuado y el sustrato cromogénico/fluorogénico tiene una concentración de 2,5 a 3,5 mM, preferentemente 3 mM.
- 35 11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho método se lleva a cabo en un medio de reacción que es una solución acuosa tamponada a un pH de 7 a 8, preferentemente a un pH de 7,4.
- 40 12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se mantiene la temperatura entre 35 y 39 °C, preferentemente a 37 °C.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la concentración del sustrato específico para la plasmina es de 0,3 a 4 mM, preferentemente de 2,5 a 3,5 mM, más preferentemente 3 mM.
- 45 14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, método que comprende las etapas de: c) determinar la tasa de liberación del producto medible durante el curso de la reacción enzimática tanto para una muestra patrón como para una muestra de prueba; d) correlacionar, matemáticamente y/o gráficamente, la tasa de liberación con la concentración de defibrotida correspondiente para obtener la actividad biológica de la muestra de prueba de defibrotida.
- 50

Figura 1

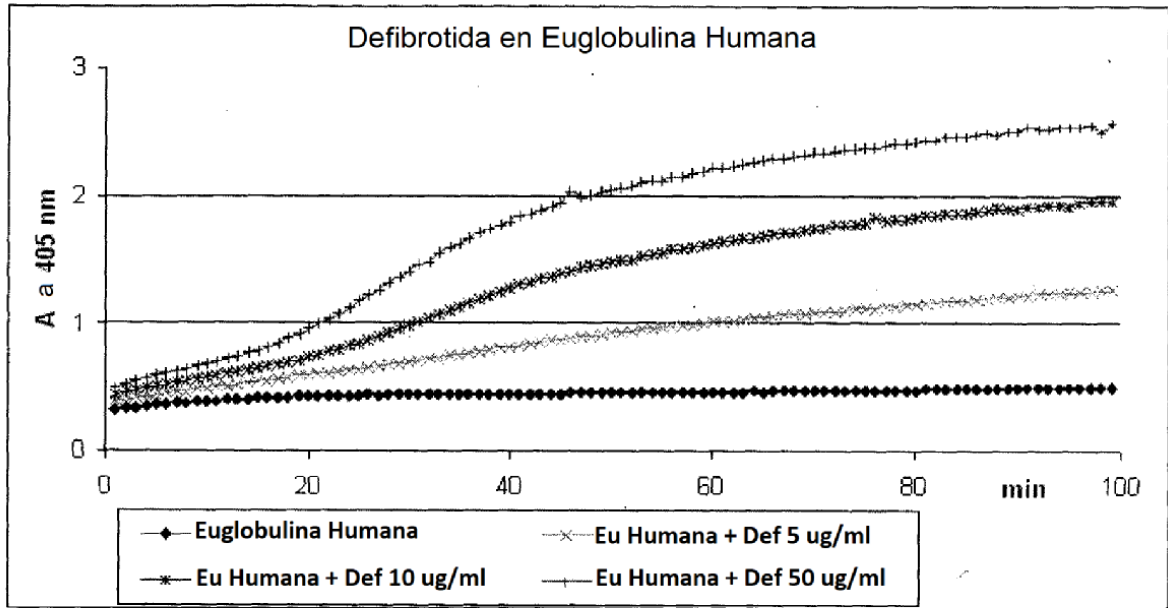


Figura 2

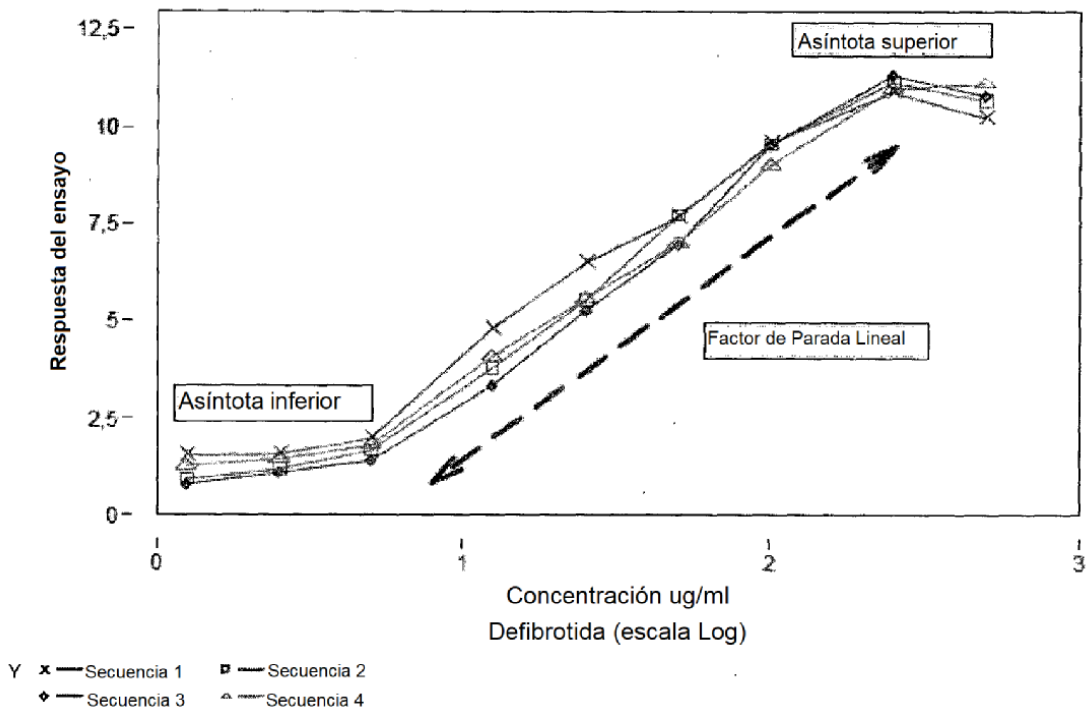


Figura 3

