

Q.F.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

~~SOLICITUD~~
PCT

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No.

04-5214C

54. TITULO

COMPOSICION PARA CATETER Y USOS DE LA MISMA

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K31/45

A61K38/49

71. SOLICITANTE

GENENTECH, INC.

DOMICILIO

SAN FRANCISCO, CA 94080, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

RAMIRO CASTRO DUQUE

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

03-06-2004

SS

PETITORIO

AS: 94.136



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación: C452140 0000003 Folios: 122
 Fecha (UCD): 2004-05-03 17:27:46
 Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NCI 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE CLEVAS CRECIENDO

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
 (71)

Nombre: GENENTECH, INC.

Dirección: 1 DNA Way, South San Francisco, CA
 94080, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACION

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
 O APODERADO

Nombre: RAMIRO CASTRO DUQUE

Dirección: Cra. 7 No. 16-56 Piso 9

Teléfono: 380-2200

Fax: 380-2700

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número 170.322 TP 1003

4

INVENTOR (ES)
 (72)

Nombre: Charles P. Samba

Dirección: 1925 Byron Street, Palo Alto, CA 94301, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US02/37878

Fecha 25-11-2002

Publicación Internacional No. WO 03/045466 A3

Fecha 05-06-2003

Título (54): COMPOSICIÓN PARA CATÉTER Y USOS DE LA MISMA

7 Clasificación Internacional (51)

A61K 38/49 // A61K 31/45

8 Prioridad

SI ☒

NO ☐

(33) País de
 Origen

US

(32) Fecha

26-11-2001

(31) Número de Solicitud

60/333.369

9 Comprobante de pago No. 04-31.630

Fecha 01-06-2004

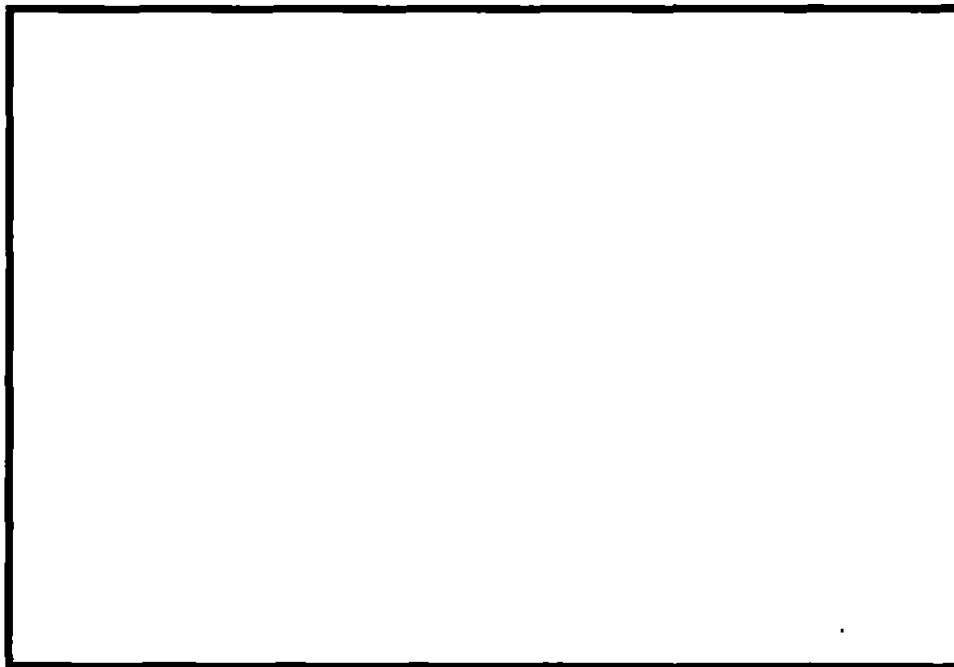
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$422.000
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Protocolo No. 14169
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros Tarjeta de propietarios.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: RAMIRO CASTRO DUQUE

FIRMA:

C.C. 170.322 de Bogotá T.P. 1003 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

M

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 04032140 62333333 Folios: 122
Fecha (ADM): 2004-06-03 17:27:46
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NRC1 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 31,630
FECHA : ABRIL 21 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	030-00110-6	21732340	21/04/2004	11,906,000.

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,0 .00
	TOTAL :	\$ 422,000.00

SOM: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
5 June 2003 (05.06.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/045466 A3(51) International Patent Classification: A61K 38/49,
38/00, 31/45, A61M 21/00, 31/00, 37/00

(21) International Application Number: PCT/US02/37878

(22) International Filing Date:
25 November 2002 (25.11.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/333,369 26 November 2001 (26.11.2001) US(71) Applicant: GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way,
South San Francisco, CA 94080 (US).(72) Inventor: SEMBA, Charles, P.; 1925 Byron Street, Palo
Alto, CA 94301 (US).(74) Agent: HASAK, Janet, E.; Genentech, Inc., MS 49, 1
DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI patent (BJ, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:
9 October 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: CATHETER COMPOSITION AND USES THEREOF

(57) Abstract: A composition useful for removal of fibrin-bound blood clots from a catheter comprises water, a fibrinolytically effective amount of a plasminogen activator, and a preservative effective amount of a bacteriostatic organic alcohol. The composition does not comprise a chelating agent.

WO 03/045466 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/37878

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 38/49, 38/00, 31/45; A61M 21/00, 31/00, 37/00

US CL : 514/2, 488, 489, 727; 424/94.1, 520; 604/500, 508, 523, 93.01; 530/350

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 514/2, 488, 489, 727; 424/94.1, 520; 604/500, 508, 523, 93.01; 530/350

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OURIEL, K. et al. Comparison of streptokinase, urokinase, and recombinant tissue plasminogen activator in an in vitro model of venous thrombolysis. November 1995, Vol. 22, pages 593-597. Entire document.	1-5, 12-17 and 24
Y	ANTANI, M. R. Catheter-directed thrombolysis for the treatment of acute deep venous thrombosis. Suppl. Appl. Radiol. July 2001, pages 29-35. Entire document.	1-5, 12-17 and 24
Y	US 6,124,277 A (SCHACHT, A. L. et al.) 26 September 2000, column 6, lines 22-36, and columns 35-36.	1, 5-6, 9, 12-14, 18-19 and 22-24
Y	US 6,206,914 B1 (SOYKAN, O. et al.) 27 March 2001, Abstract, columns 10-11 and column 13, lines 29-45.	1, 5-6, 9, 12-14, 18-19 and 22-24
Y, P	US 2002/0082582 A1 (FINCH, C. D. et al.) 27 June 2002, claims 1-27, abstract, and paragraphs 4-5, 7, 10, 12-16.	1, 5-7, 10-14 and 18-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 July 2003 (21.07.2003)

Date of mailing of the international search report

04 AUG 2003

Name and mailing address of the ISA/US

Mali Stop PCT, Attn: ISA/US

Commissioner for Patents

P.O. Box 1450

Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Dalene Bell-Harris

Telephone No. 703-308-0196

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
5 June 2003 (05.06.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/045466 A2

(51) International Patent Classification⁷: A61M

(21) International Application Number: PCT/US02/37878

(22) International Filing Date:
25 November 2002 (25.11.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/333,369 26 November 2001 (26.11.2001) US

(71) Applicant: GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way,
South San Francisco, CA 94080 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

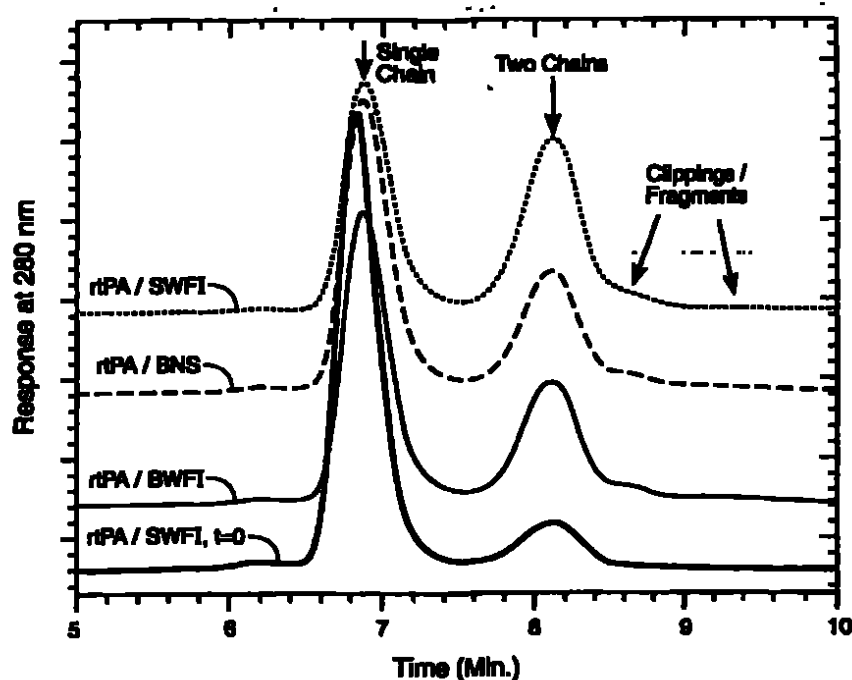
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(72) Inventor: SEMBA, Charles, P.; 1925 Byron Street, Palo Alto, CA 94301 (US).

(74) Agent: HASAK, Janet, E.; Genentech, Inc., MS 49, 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: CATHETER COMPOSITION AND USES THEREOF



(57) Abstract: A composition useful for removal of fibrin-bound blood clots from a catheter comprises water, a fibrinolytically effective amount of a plasminogen activator, and a preservative effective amount of a bacteriostatic organic alcohol. The composition does not comprise a chelating agent.

WO 03/045466 A2

7
R

5 CATHETER COMPOSITION AND USES THEREOF

Background of the Invention10 Field of the Invention

The present invention relates to the field of indwelling medical devices, in particular catheters, as well as to the field of methods and compositions for flushing, locking, priming, and coating these medical devices. The invention also relates to pharmaceutical preparations useful in increasing catheter flow and preventing infection in catheters with the potential for fibrin deposition or with preexisting fibrin-bound clots.

Description of Related Disclosures

Delivery systems are widely used in medicine as a means for introducing liquid material that might include medicaments, nutrition, or other active agents to a particular locus in a patient. Such systems frequently involve the use of catheters, which, for many applications, are surgically or intravenously located and stitched into place for long-term administration of the desired material. Typical systems include central catheters such as may be used for total parenteral nutrition (TPN) used in, e.g., short bowel syndrome (for the duration of life), with the risk of sepsis or endocarditis. Such systems also include catheters and drains that are involved in peritoneal dialysis for those with terminal kidney failure, which, if infected, can lead to peritonitis with serious consequences.

Intravascular catheters are among the most commonly used medical devices. Such catheters are routinely placed into a patient's vascular system for many procedures and often are left in place for extended periods. One type of delivery system used for some years in the treatment of conditions in humans comprises a reservoir or chamber of small volume subcutaneously implanted under the fascia having direct access via a catheter to the cardiovascular system. Such systems are known as port systems. Since a port and an intravascular catheter are direct paths from

the outside environment to the patient's bloodstream, the presence of the catheter or port presents a substantial and continuous potential for introduction of microorganisms into the patient's bloodstream.

5 It is now generally acknowledged that indwelling catheterization in medical, surgical, gynecological, urological and other patients can lead to serious infection of the urogenital tract. Practitioners have developed many protocols related to placement, use, attachment and detachment of fluid-handling
10 devices and other procedures related to catheters. The goal of almost all of these procedures is to avoid introduction of a microorganism into the patient's bloodstream.

A number of methods for reducing the risk of infection have been developed that incorporate anti-infective agents into medical
15 devices, none of which have been clinically proven to be completely satisfactory. Such devices desirably provide effective levels of anti-infective agent during the entire period that the device is being used. This sustained release may be problematic to achieve, in that a mechanism for dispersing anti-infective agent
20 over a prolonged period of time may be required, and the incorporation of sufficient amounts of anti-infective agent may adversely affect the surface characteristics of the device. The difficulties encountered in providing effective anti-microbial protection increase with the development of drug-resistant
25 pathogens.

The current standard care of vascular catheters includes flushing the lumen of the catheter with an anti-coagulant, such as heparin, to prevent blood in and around the tip of the catheter from coagulating and obstructing the flow of fluids through the
30 catheter. Furthermore, heparin has no anti-microbial activity, and, in addition, if not carefully controlled, it can carry the anti-coagulation process too far, thereby presenting a risk of hemorrhage. Heparin can also result in antibody formation, leading to a serious autoimmune condition of heparin-induced
35 thrombocytopenia (HIT), which depletes platelets and further increases risk of bleeding. Thus, infections, as well as thrombotic occlusion, continue to occur frequently despite the

prophylactic use of heparin flushes. Knowledge of the pathogenesis and microbiology of central venous catheter-related infections is essential to provide effective prevention of this problem.

5 *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* account for 75% of central venous catheter (CVC)-related infections. *Candida* species account for another 10% to 15% of such infections. The use of anti-staphylococcal antibiotics to prevent these infections has been found to reduce CVC-related bacterial infections, but only at
10 the expense of the occurrence of higher rates of fungal (*Candida*) infections.

There is also an observed correlation between thrombogenesis and infection. Essentially, a fibrin sheath that subsequently acts to cover the internal and external surfaces of a catheter
15 engulfs indwelling vascular catheters. This fibrin sheath provides such organisms as *Staphylococci* and *Candida* with an enhanced adherence capacity to the catheter surface. Unlike these particular microbes, gram-negative bacilli do not adhere well to fibrin and fibronectin. A composition that halted fibrin
20 formation would thus be particularly useful in preventing the colonization of *Staphylococci*, *Candida*, and the like, at indwelling catheter sites.

When a medicament is introduced into a patient through a catheter, the practitioner commonly follows the introduction with
25 a flush solution that may include an anticoagulant such as heparin. The purpose of the flush solution is to move the medicament out of the catheter so that the entire dosage is delivered, and to leave a residual fill in the catheter so that the patient's blood does not back up in the catheter and possibly
30 form a clot that would occlude the bore of the catheter. Thus, when the catheter is subsequently needed again, the properly flushed catheter is likely fully patent and ready for the next usage.

Root et al., Antimicrob. Agents Chemother., 32: 1627-1631
35 (1988) published a study that reported on the effect in catheters of disodium ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), a compound well known for its chelating properties *in vivo* and widely used as

an anticoagulant in vitro. U.S. Pat. No. 5,363,754 disclosed that pharmaceutical compositions of a mixture of minocycline and EDTA were useful in maintaining the patency of a catheter port. U.S. Pat. No. 5,091,442 described tubular articles, such as condoms and catheters, which are rendered anti-microbially effective by the incorporation of a non-ionic sparingly soluble anti-microbial agent, such as triclosan. The anti-microbial agent may be distributed throughout the article, or in a coating thereon. U.S. Pat. No. 5,362,754 disclosed a pharmaceutical preparation that includes minocycline and EDTA for maintaining the patency of a catheter. U.S. Pat. No. 5,362,754 reported the use of a mixture of minocycline and EDTA (M-EDTA) to maintain the patency of a catheter port.

Purchase et al., Nephron, 58: 119-20 (1991) disclosed use of calcium chelators, including citrate, for this purpose. Butuovic et al., Artif. Organs, 22: 945-7 (1998) disclosed that citrate and polygeline, which is a plasma substitute made from cow bones, were equally as effective as heparin in maintaining the catheter. In a talk presented at the 30th annual meeting of the American Society of Nephrology, held Nov. 2-5, 1997 in San Antonio, Tex., Sodemann et al. reported that the replacement of catheters due to infection can be avoided by routine application of the concentrated gentamicin/citrate mixture.

However, one citrate calcium chelator for dialysis catheters, designated TRICITRASOL™, has certain drawbacks. Some patients reported dysgensia for a short period immediately after the injection of citrate. Recently the FDA reported a case of a patient who died shortly after the injection of citrate as a catheter lock (Stas et al., Nephrol Dial Transplant, 16: 1521-1522 (2001); FDA issues warning on triCitrasol (trademark) dialysis catheter anticoagulant. FDA Talk Paper T00-16, 14 April 2000.

U.S. Pat. No. 5,019,096 disclosed infection-resistant medical devices comprising a synergistic combination of a silver salt (such as silver sulfadiazine) and chlorhexidine. U.S. Pat. No. 5,772,640 reported on polymeric medical articles comprising the anti-infective agents, chlorhexidine and triclosan. U.S. Pat. No. 5,362,754 disclosed preventing glycocalyx formation on a catheter

by coating with EDTA and/or minocycline, preventing bacterial and fungal infections. U.S. Pat. No. 6,258,797 disclosed combating infection or sepsis in catheter and port systems by using an anti-microbial locking solution of taurolidine or taurultam.

5 U.S. Pat. No. 6,166,007 disclosed anti-microbial locks comprising taurinamide derivatives and carboxylic acids and/or salts thereof for preventing infection and blood coagulation in or near a medical prosthetic device after the device has been inserted in a patient. EP 1,040,841 described prevention of
10 thrombosis formation and/or bacterial growth on a liquid-contacting surface of a delivery system by contacting the surface with a thrombosis-preventing liquid having anti-coagulant agent, taurolidine, and/or taurultam. EP 882,461 disclosed a medical device having both physiological and anti-microbial activity
15 comprising a base material, a crosslinked coating film formed on a surface of the base material, and each of a physiologically active substance and an anti-microbial substance bonded to the coating film.

Boorgu et al., ASAIO J., 46 (6): 767-770 (Nov. 2000)
20 published on an adjunctive antibiotic/anticoagulant lock therapy in the treatment of bacteremia associated with the use of a subcutaneously implanted hemodialysis access device. Attached to the device are two catheters that are implanted into the superior vena cava or right atrium. An antibiotic/anticoagulant lock
25 therapy entailed the instillation of both an antibiotic and an anticoagulant into the device. See also Schwartz et al., Journal of Clinical Oncology., 8(9):1591-1597 (1990) and Kamal et al., JAMA, 265(18):2364-2368 (1991).

30 Wiernikowski et al., Am J. Pediatr Hematol Oncol. 13(2): 137-140 (1991) disclosed that bacteriostatic saline flush solutions prevented catheter infections compared to normal saline. Vercaigne et al., Pharmacotherapy, 20: 394-9 (2000) evaluated heparin plus antibiotics as a locking solution to prevent infection. Patel et al., Thromb Hemost, 82: 1205-6 (1999)
35 disclosed successful use of low-dose r-hirudin for recurrent dialysis catheter thrombosis in a patient with heparin-induced thrombocytopenia. Darouiche et al., Nutrition, 13(4)(suppl): 26S-

298 (1997) reported that the prevention of vascular catheter-related infection can be achieved using anti-microbial agents involving the application of topical disinfectants such as chlorhexidine, use of silver-impregnated subcutaneous cuffs (for short-term CVCs), flushing of catheters with a combination of anti-microbial and anti-thrombotic agents, and coating of catheters with either antiseptic (chlorhexidine and silver sulfadiazine) or anti-microbial agents (minocycline and rifampin).

Antibacterial lock solutions have been used to clean out catheters. For example, U.S. Pat. No. 6,174,537 disclosed a catheter flush solution. See also Sodermann et al. Blood Purif., 19: 251-254 (2001) on DIALOCK™ and CLS; the TUBEX™ Heparin Lock Flush Solution (Wyeth-Ayerst); and Henrickson et al., J. Clin Oncol., 18: 1269-1278 (2000) on prevention of CVC-related infections and thrombotic events using vancomycin/ciprofloxacin/heparin flush solution.

Soft-cuffed, implantable CVCs such as the QUINTON PERMCATH™ CVC (Quinton Instrument Co., Seattle, WA) are increasingly used in patients with end-stage renal disease as a means of permanent access. Their major limitations, besides infection, are thrombosis and inadequate blood flow. To prevent those complications, heparin is conventionally used for priming the QUINTON PERMCATH™ CVC between dialysis sessions. Schenk et al., Amer. J. Kidney Diseases, 35: 130-136 (Jan. 2000) showed that recombinant tissue-plasminogen activator (rt-PA) was superior to heparin for priming the QUINTON PERMCATH™ CVC between hemodialysis sessions. However, Schenk et al. utilized 2 mg of alteplase plus SWFI (sterile water for injection, USP), which does not prevent growth of bacteria.

Central venous access device (CVAD) occlusions or blockages due to formation of a blood clot (thrombus) within or at the tip of the CVAD catheter are a common problem that can block the administration of therapies to patients. Estimates suggest that 25% of CVADs become occluded, with thrombosis as the most common etiology (Haire et al., Thromb. Haemost., 72: 543-547 (1994); Rubin, J. Clin. Oncol., 1: 572-573 (1983); Lokich et al., J. Clin. Oncol., 3: 710-717 (1985)). In 1994, Haire et al., *supra*,

performed a double-blind, prospective, randomized trial of urokinase versus alteplase (t-PA) in dysfunctional catheters proven radiographically to be occluded by thrombus. Catheters were treated with 2 mg of alteplase or 10,000 U of urokinase that was allowed to dwell in the device for 2 hours. After up to two treatments, alteplase restored function in more catheters than urokinase (89% versus 59% ($p = 0.013$)).

On September 4, 2001 the U.S. Food and Drug Administration (FDA) approved the thrombolytic agent CATHFLO™ ACTIVASE® (alteplase) t-PA, for the restoration of function to CVADs, as assessed by the ability to withdraw blood. CATHFLO™ ACTIVASE® t-PA is available in a 2-mg, single-patient-use vial, is the only marketed thrombolytic available for this indication, and offers medical professionals a viable treatment option for a CVAD complication that can hinder patient care. One vial of CATHFLO™ t-PA contains 2.2 mg of alteplase, 77 mg of L-arginine, 0.2 mg of POLYSORBATE 80™ emulsifier, and phosphoric acid to adjust the pH to approximately 7.3.

T-PA has been bonded to other materials than vascular catheters. See, for example, Zhou et al., J. Control Release, 55: 281-295 (1998); Greco et al., Ann Vasc. Surg, 9: 140-145 (1995) and Woodhouse et al., Biomaterials, 17: 75-77 (1996).

U.S. Pat. No. 5,688,516 disclosed use of selected combinations of a chelating agent, anticoagulant, or anti-thrombotic agent, with a non-glycopeptide anti-microbial agent, such as the tetracycline antibiotics, to coat a medical device and to inhibit catheter infection. Preferred combinations include minocycline or another non-glycopeptide anti-microbial agent together with EDTA, EGTA, DTPA, TTH, heparin, and/or hirudin in a pharmaceutically acceptable diluent. U.S. Pat. No. 6,187,768 similarly disclosed use of an anti-microbial agent and an anticoagulant, an anti-thrombotic agent, or a chelating agent to maintain the patency of indwelling medical devices such as catheters and for preventing infections caused by bacterial growth in catheters.

Notwithstanding the above-described contributions to the art, a need continues to exist for a non-toxic method for removal of

fibrin-bound blood clots from catheters, especially indwelling medical devices. There is a further need for the prevention and the removal of fibrin from such devices, as certain bacteria have binding sites that favor sticking to fibrin, in particular.

5 Summary of the Invention

The present invention discloses solutions unique in their ability to meet the above needs, which are not based on anti-coagulation, anti-thrombotic, or chelating activities and do not involve the use of antibiotics, for which mammals can develop
10 resistance. The present invention solves the needs set forth herein by using a plasminogen activator in conjunction with a disinfectant used as a preservative, mainly an organic alcohol that serves in this capacity. The resulting composition not only has fibrinolytic activity, but also prevents pathogen growth,
15 especially in clotted catheters, and has passed USP standards.

The invention is as claimed. Specifically, in one aspect the present invention provides a composition useful for removal of fibrin-bound blood clots from a catheter comprising water, a fibrinolytically effective amount of a plasminogen activator, and
20 a preservatively effective amount of a bacteriostatic organic alcohol, wherein the composition does not comprise a chelating agent.

In another aspect the invention provides a multi-compartment package comprising a compartment comprising a fibrinolytically
25 effective amount of a plasminogen activator, a compartment comprising water containing a preservatively effective amount of a bacteriostatic organic alcohol, wherein neither compartment comprises a chelating agent, and instructions for mixing the contents of both compartments and for using the resulting mixture
30 to remove fibrin-bound blood clots from a catheter that contains such blood clots.

In yet another aspect, the invention provides a multi-compartment package comprising a compartment comprising from about 0.1 to 10 mg/mL of native-sequence t-PA or tenecteplase and a
35 compartment comprising water containing about 0.5 to 1.2% (v/v) of benzyl alcohol, isopropanol, or ethanol, wherein neither compartment comprises a chelating agent, and instructions for

mixing the contents of both compartments and for using the resulting mixture to remove fibrin-bound blood clots from a catheter that contains such blood clots.

The preferred amount of benzyl alcohol, a preferred alcohol herein, is about 0.8 - 1.1%. This range and the broader range of about 0.5 to 1.2% are enough to inhibit microbe growth but preserve stability and function of the plasminogen activator. An advantage of these alcohols is that they do not lead to antibiotic resistance.

In a still further embodiment, the invention provides a method for removing fibrin-bound blood clots from a catheter that contains such blood clots comprising contacting the catheter with the above composition for at least about 5 days.

In a yet further embodiment, the invention provides a catheter coated with the above-identified composition.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 shows reduced SEC chromatograms of reconstituted rt-PA (1 mg/mL with BWFI, BNS, and SWFI) after 14 days of storage at 37°C in glass vials.

Detailed Description of the Preferred Embodiments

Definitions

As used herein, "catheter" refers to a medical device generally constructed of plastic polymers such as, for example, polyurethane, silicone, or other such polymers for the purpose of delivering medical therapy and withdrawing blood. Such catheters represent a wide variety of indwelling medical devices such as a urinary catheter, a vascular catheter such as a CVC or a peripheral intravenous catheter, an arterial catheter, a tracheal catheter, a Swan-Ganz catheter, a hemodialysis catheter, an umbilical catheter, a percutaneous non-tunneled silicone catheter, a cuffed tunneled central venous catheter, and a subcutaneous central venous port, and the like.

"Vascular catheter" is used herein to describe a catheter involving the vascular system and includes peripheral catheters and CVCs, long-term cuffed devices, short-term, non-cuffed devices, and implantable ports. CVCs, which are the same as central venous access devices (CVADs), include peripherally

inserted central catheters (PICC lines), external cuffed devices, non-cuffed catheters, non-tunneled and subcutaneously tunneled catheters, hemodialysis (HD) catheters, and ports.

The preferred catheters herein are an indwelling catheter such as a CVC, preferably a cuffed tunneled CVC, a peripheral intravenous catheter, an arterial catheter, a Swan-Ganz catheter, a hemodialysis catheter, an umbilical catheter, a percutaneous non-tunneled silicone catheter, or a subcutaneous central venous port. Also preferred is a urinary catheter or a peritoneal catheter. Additionally preferred are an intravenous catheter, one that is fabricated from a biomedical polyurethane or silicone, or a vascular catheter.

As used herein, "preparation" or "composition" refers to a composition, solution, formulation, or the like that is an admixture of the ingredients set forth.

As used herein, the terms "contact," "contacting," and the like mean exposure to a reagent, by any means, such as coating, incubating, etc.

The terms "coat", "coated," etc., as used herein, refer to dipping, soaking, treating, and/or impregnating a catheter with the composition herein.

As used herein, "bacteriostatic organic alcohol" means an organic alcohol that is a disinfectant used as a preservative, and not classified as an antibiotic or in a class of antibiotic. Disinfectants, which are chemicals that inhibit or kill microorganisms, are defined in Basic and Clinical Pharmacology, 8th edition (2001), Section VII. Chemotherapeutic Drugs. Chapter 50. Miscellaneous Antimicrobial Agents - Disinfectants, Antiseptics, and Sterilants. Preservatives are chemicals used to prevent microbial spoilage of preparations. Disinfectants are used as preservatives to prevent the overgrowth of bacteria and fungi in pharmaceutical preparations. They must be effective in preventing growth of microorganisms likely to contaminate them, and must have sufficient solubility and stability to remain active, as per Ellenhorn's Medical Toxicology 2nd Ed (1997), Section IV. Chemicals. Chapter 57. Antiseptics and Disinfectants. Examples of such organic alcohol preservatives include ethanol,

isopropanol, and benzyl alcohol, which are preferred herein, with benzyl alcohol being most preferred. Benzyl alcohol, which is hydrophobic, can disrupt cell walls and membranes of microorganisms, denature proteins, and inactivate enzymes.

5 "Bacteriostatic water for injection" or "BWFI" refers to a mixture of water and varying amounts of benzyl alcohol and water with no other ingredients as defined by the United States Pharmacopeia (USP).

10 As used herein, "sterile water for injection" or "SWFI" is sterile water alone without any other ingredient.

As used herein, "normal saline" or "NS" is a mixture of water with an appropriate amount (such as 0.9% (w/v)) of sodium chloride, with no other ingredients.

15 As used herein, "bacteriostatic normal saline" or "BNS" refers to sterile water with an appropriate amount (such as 0.9% (w/v)) of sodium chloride and with an appropriate amount (i.e., one that is preservatively effective) of a bacteriostatic organic alcohol such as benzyl alcohol without any other ingredient.

20 As used herein, the term "plasminogen activator" means a fibrinolytic single- or double-chain plasminogen activator, including urinary plasminogen activator in native or variant form, tissue plasminogen activator in a native form such as ACTIVASE® alteplase t-PA or in variant form such as r-PA (reteplase; RETAVASE®; Centacor, Inc.) and tenecteplase (a t-PA variant
25 designated T103N, N117Q, K296A, H297A, R298A, R299A available as TNKASE™ brand from Genentech, Inc. and described, for example, in U.S. Pat. No. 5,612,029), as well as urokinase (e.g., ABBOKINASE®; Abbott), which may be a naturally occurring native molecule or a variant of urokinase that has the function of a fibrinolytic in
30 dissolving clots in the blood and preventing and removing fibrin. Preferably, the plasminogen activator is native-sequence t-PA, a fibrinolytic t-PA variant, native-sequence urokinase, or a fibrinolytic urokinase variant. More preferably, the plasminogen activator is native-sequence t-PA, a fibrinolytic t-PA variant, or
35 native-sequence urokinase. Still more preferably, the plasminogen activator is native-sequence t-PA or a fibrinolytic t-PA variant. Still more preferably, the t-PA variant is tenecteplase or

reteplase. Most preferably the plasminogen activator is native-sequence t-PA or tenecteplase.

As used herein, 'chelating agent' means an agent used for chelating, such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), DMSA, deferoxamine, dimercaprol, zinc citrate, TRICITRASOLTM (a citrate calcium chelator), a combination of bismuth and citrate, penicillamine, succimer, or etidronate. Ethylene glycol-bis-(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) and diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) and salts thereof are other known chelating agents, as well as edetate calcium disodium, triethylene tetramine dihydrochloride, and those that chelate divalent metal cations such as Ca, Mg, Mn, Fe and Zn.

Modes for Carrying out the Invention

The present invention provides a composition useful for removal of fibrin-bound blood clots from a catheter comprising water, a fibrinolytically effective amount of a plasminogen activator, and a preservatively effective amount of a bacteriostatic organic alcohol. The composition does not contain a chelating agent.

The water preferably contains the bacteriostatic organic alcohol to begin with. There are generally four types of diluents that are used to dilute or reconstitute drugs: BWFI, SWFI, BNS, and NS. The present invention includes only those that are bacteriostatic, i.e., BWFI and BNS. Preferably, the water containing the alcohol is bacteriostatic water for injection or is bacteriostatic normal saline.

The pH of the composition herein must be appropriate for biological use. Typically, the composition or solution of the present invention will have a pH in the range of from about 3 to 7, preferably from about 3.5 to 6.5 and, most preferably from about 4.5 to 6.5. The composition will normally be at a physiological pH. If necessary, the pH can be adjusted by additional acid or base, such as a mineral acid, for example, hydrochloric acid, or, preferably, one that will not cause acidosis, such as, for example, acetic, malic, or lactic acid. Other methods for adjusting the pH, familiar to those of skill in the art, can also be employed.

13

A test for whether the amount of plasminogen activator in the composition is fibrinolytically effective can be done, for example, by *in vitro* clot lysis assays, such as those described in the Examples provided herein.

5 The preservatively effective amount of alcohol can be determined, for example, by the anti-microbial effectiveness test set forth in the Examples below. Preferably the amount of plasminogen activator is from about 0.1 to 10 mg/mL and the preservatively effective amount of organic alcohol is preferably
10 from about 0.5 to 1.2% (v/v). More preferably, the fibrinolytically effective amount of plasminogen activator is from about 0.3 to 5 mg/mL, still more preferably from about 0.5 to 4 mg/mL, and most preferably from about 1 to 3 mg/mL. The more preferred amount of organic alcohol is from about 0.8 to 1.1%
15 (v/v).

The composition of the invention is preferably exposed to conditions that substantially render any microorganisms therein non-viable and packaged in a sealed vessel, such as a syringe, a septum-closed vial, or an ampoule that is substantially resistant
20 to the passage of microorganisms. Preferably, the sealed vessel contains an aliquot of the flush solution that is sufficient to perform one catheter flush procedure. For particular applications, a bulk vessel may be preferred that contains a sufficient amount of the solution to dispense multiple aliquots
25 for individual catheter flush procedures.

A method for flushing an intravenous catheter includes providing an admixed solution as set forth above and contacting the catheter with such solution for at least about two hours. The method includes filling a fluid-handling device, preferably a
30 syringe, with an aliquot of the solution sufficient to perform a catheter flush procedure. The preferred amount for the flush procedure is generally about one to three milliliters. The practitioner then attaches the syringe to the target intravascular catheter that requires flushing and administers the solution into
35 the catheter, thereby completing the flush procedure.

The method herein may be used to remove preexisting blood clots at virtually any tunneled or untunneled catheter. As part of

a catheter maintenance or flushing regimen, the catheter most preferably is to be flushed with the composition herein, for example, once a week, once every 4 days, once every 2 days, once a day (about every 24 hours), twice a day, every four hours or as
5 needed according to patient needs, as would be known to the skilled practitioner. The catheter-flushing regimen may simply constitute once every time that the catheter is changed. In a preferred aspect of the method, the catheter is to be flushed more frequently at four-hour intervals with the compositions herein.

10 Although the method of this invention applies to introducing the composition into catheters that are already in place, those skilled in the art will understand that contacting or coating the catheter outside the body with the composition can prevent the deposition of fibrin on such surface after its implantation and
15 reduce sites for bacterial growth. Thus, the surfaces of catheters, such as hemodialysis catheters, can be pretreated by the composition herein. The catheter can be treated with a composition initially and then, after insertion, subjected to repeated periodic flushing.

20 Particular exemplary catheters that may be prepared and coated with the compositions of the present invention are provided in the above list. In the coating method the plasminogen activator, water, and alcohol are present in amounts such that their combination, in the treated article, has effective
25 fibrinolytic and preservative activity. In a specific embodiment, the catheter is a polyurethane or silicone catheter (or one made from similar polymers) that has been treated with (i.e., dipped or soaked in) a treatment solution as set forth above. The surface of the catheter of interest is then exposed to the composition for
30 a period of time sufficient to allow the formation of a film or coating of the composition on the exposed surface of the device. As a liquid, the composition would be allowed to dry on the surface of the device so as to form a film.

35 The amount of the composition herein injected into a catheter will be sufficient to fill it. Such devices, when they are hemodialysis catheters, typically have internal volumes in the range of from about 0.1 to 10 mL. Such quantities will, of

114

course, vary with the length and diameter of the tubing of the device, which, *inter alia*, can be a function of the size of the individual patient.

If fibrin-bound blood clots are being removed from a catheter the catheter may be contacted with the solution herein for at least about 5 days, preferably about 6 to 15 days.

The present invention in still another aspect provides a kit or package. In one embodiment, the kit or package comprises a container means, such as a compartmentalized syringe, that comprises at least two separate compartment means. One compartment or container means comprises a fibrinolytically effective amount of a plasminogen activator such as t-PA, and the second container means or compartment comprises water containing a preservatively effective amount of a bacteriostatic organic alcohol. As with the composition, neither compartment comprises a chelating agent. The package also contains instructions for mixing the contents of both compartments and for using the resulting mixture to remove fibrin-bound blood clots from a catheter that contains such blood clots. The t-PA may be a lyophilized powder that in dry powder form is then reconstituted when mixed with the water to provide a solution suitable for use. The kit may additionally include a container that is a carrier means adapted to receive the contents of the two compartments. The package herein may be a kit, wherein each compartment is a separate container such as a vial or ampoule, or the package may be a multi-compartment syringe.

Various features and aspects of the present invention are illustrated further in the examples that follow. While these examples are presented to show one skilled in the art how to operate within the scope of the invention, they are not intended in any way to serve as a limitation upon the scope of the invention. The disclosure of all citations herein is expressly incorporated herein by reference.

EXAMPLE 1 (Comparative)**Summary**

Testing was performed as described below to evaluate the anti-microbial properties of 2 mg/mL of ACTIVASE® t-PA when reconstituted in SWFI. This sample did not meet the requirement of the USP anti-microbial effectiveness test.

USP Anti-Microbial Effectiveness Test

This test is used to evaluate the efficacy of a preservative in a formulation or to assess the intrinsic anti-microbial activity of an active ingredient. It is described in USP 24, 'Microbiological Tests/(51) Antimicrobial Effectiveness Testing, pages 1809-1811.

A. Materials and Major Equipment

1. The challenge organisms used were *Escherichia coli*, ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 9027, *Staphylococcus aureus*, ATCC 6538, *Candida albicans*, ATCC 10231, and *Aspergillus niger*, ATCC 16404.

2. Media, supplies, and major equipment were:

Trypticase soy agar (TSA)

Sabouraud dextrose agar (SDA)

Phosphate buffered saline (PBS), sterile, pH 7.2 ± 0.2

Sterile 50-mL conical tubes

Sterile swabs and serological pipettes

Spectrophotometer

Colony counter, Quebec or equivalent

Incubators at $2-8^{\circ}\text{C}$, $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$, and $32.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$

B. Procedure**1. Preparation of inoculum:**

Each organism suspension was prepared to achieve an approximate concentration of 1×10^8 colony-forming units (CFU)/mL. Each of the five tubes containing 10 mL of sample was inoculated with 0.05 mL of its corresponding challenge organism, resulting in an initial concentration from between 1×10^5 CFU/mL and 1×10^6 CFU/mL of the test preparation. The initial population of viable organisms in each test preparation was calculated based on the concentration of the organisms in each of the standardized inocula by the Pour Plate Method. This method is a common microbiological

technique to count the number of organisms in a test sample. The test sample is diluted with sterile saline and pipetted onto a sterile Petri dish. Then melted agar (the nutrient media) is poured into the Petri dish and mixed with the sample and incubated at a standardized temperature and time. This method yields colonies that form throughout the agar - not just on the surface.

Approximately 10 mL of sample was poled into a tube left uninoculated to serve as a Negative Control. At T = day 7, day 14, and day 28, the population of each organism in the inoculated samples and in the Negative Control was determined by the Pour Plate Method, the validated plate count method. Incubation conditions for the Pour Plate Method are shown in Table 1.

2. Validation of the Pour Plate Method:

The sample was serially diluted to obtain 10^{-1} and 10^{-2} dilutions. A 1-mL portion of each sample dilution was added to each of 5 Petri plates. For each sample dilution, a 0.1-mL aliquot containing approximately 1×10^3 CFU/mL of each challenge organism was added to its corresponding Petri plate. In parallel, the same inoculum volume of each organism was aliquoted into each of two plates without the sample dilutions for count confirmation. A 15-20 mL portion of molten agar held at approximately 45°C was added to each plate and swirled gently to mix the contents. The plates were allowed to solidify and incubated as indicated in Table 1.

3. Preparation of sample

10 mL of sample was delivered into each of five vials. Each vial was labeled separately with "EC", "PA", "SA", "CA", and "AN", so one vial was labeled for each organism to be tested. Ten mL of sample was delivered into one vial labeled negative control. Alternatively, for the delivering and labeling steps above, 20 mL of sample was delivered into each vial.

4. Bioburden determination

Using the negative control, the bioburden of the sample was determined by the Pour Plate Method. The media and incubation conditions were used as set forth in Table 1.

5. Inoculation of sample

0.05 mL of each of the organism suspensions was inoculated at 1×10^8 CFU/mL into the corresponding sample vial containing 10 mL of sample. The volume of the suspension inoculum used was 0.5% of the volume of the sample. The mixture was vortexed thoroughly. The final concentration of the test preparation was approximately 5.0×10^5 CFU/mL. Alternatively, if a 20-mL sample volume was used in each vial, for the inoculation step above 0.1 mL of each of the challenge suspensions was delivered.

6. Initial concentration count confirmation

The plate count of each standardized inoculum was determined (1.0×10^8 CFU/mL) by the Pour Plate Method. The media and incubation conditions used are set forth in Table 1. The plate counts were performed in duplicate to obtain the average plate count of each standardized inoculum. The initial concentration of each challenge organism in the test preparation was calculated using the following equation:

$$S \times \frac{I}{P}$$

where

S = average organism concentration of standardized suspension (1.0×10^8 CFU/mL)

I = inoculum volume (0.05 mL)

P = volume of test preparation (10 mL)

7. Sample storage and test intervals

The inoculated containers and the negative control were incubated at $22.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ protected from light. Each container was sampled at specified time points in Table 2. The plate count of the inoculated samples and the negative control was performed by the Pour Plate Method. The plate count was performed in duplicate. Media and incubation conditions were used as set forth in Table 1.

1716

TABLE 1
Incubation Conditions for Pour Plate Method

Organism	Suitable Medium	Incubation Temperature (°C)	Incubation Time (days)
<i>E. coli</i> ATCC 8739	TSA	32.5 + 2.5	3-5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	TSA	32.5 ± 2.5	3-5
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	TSA	32.5 + 2.5	3-5
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	SDA	22.5 ± 2.5	3-5
<i>A. niger</i> ATCC 16404	SDA	22.5 + 2.5	3-7

5

TABLE 2
Plating Time Points for Parenterals

	0 hr	6hr	24 hr	7 d	14 d	28 d
USP (bacteria, yeast, and mold)	NA	NA	NA	R	R	R
EP (bacteria)	R	R	R	R	R	R
EP (yeast and mold)	R	NA	NA	R	R	R

10

NA = not applicable
R = required

C. Acceptance Criteria

15

1. For a valid challenge study, the concentration of challenge organisms in each test preparation was between 1×10^5 CFU/mL and 1×10^6 CFU/mL. There was no detectable bioburden in the sample used in the validated plate count method.

20

2. For a valid plate count method, the average count of the recovered inocula at each dilution level must be greater than or equal to 50% of the average count for the corresponding control. If the average count of the recovered inocula at a dilution. If the average count is less than 50%, all counts at that dilution are considered invalid.

25

D. Interpretation

1. USP

For bacteria, there should be not less than a 1.0 log reduction from the initial calculated count at 7 days, not less than 3.0 log₁₀ reduction from the initial count at 14 days, and no increase from the 14-day count at 28 days.

30

For yeast and mold, there should be no increase from the initial calculated count at 7, 14, and 28 days. "No increase" is defined as not more than 0.5 log₁₀ unit higher than the previous value measured.

2. EP

The criteria for evaluation of anti-microbial activity for parental preparations are in Table 3 in terms of the log reduction in the number of viable microorganisms against the value obtained for the inoculum.

TABLE 3
EP Criteria for Evaluation of Anti-microbial Activity
for Parenterals

	Log Reduction					
	Criteria*	6 h	24 h	7 d	14 d	28 d
Bacteria	A	2	3	-	-	NR
Bacteria	B	-	1	3	-	NI
Fungi	A	-	-	2	-	NI
Fungi	B	-	-	-	1	NI

NR = No recovery.

NI = No increase. "No increase" is defined as not more than 0.3 log₁₀ unit higher than the previous value measured.

*The A criteria expresses the recommended efficacy to be achieved. In justified cases where the A criteria cannot be attained, for example, for reasons of an increased risk of adverse reactions, the B criteria must be satisfied.

Test with ACTIVASE® t-PA and SWFI

A. Materials, Equipment, and Procedures

The sample was 2 mg/mL of ACTIVASE® alteplase t-PA in a vial with SWFI containing no benzyl alcohol.

The challenge organisms and all media, supplies, and major equipment were those set forth in the test above. The procedure used was the same as that described in the test above, and the incubation conditions were as in Table 1. The acceptance criteria and interpretation were the same as in the test above.

Results

The calculated initial concentration of challenge organisms in each test preparation was between 1×10^5 CFU/mL and 1×10^6 CFU/mL (Table 4).

There was no detectable bioburden in the sample using the Pour Plate Method (Table 5).

The plate count method was validated using the Pour Plate Method. The average recovered inoculum at the 10^{-1} dilution of the sample was greater than or equal to 50% of the average of the corresponding control (Table 6).

For *P. aeruginosa* and *S. aureus*, there was a greater than or equal to $1.3 \log_{10}$ reduction from the calculated initial concentration at day 7, a less than $3.0 \log_{10}$ reduction at day 14 and a greater than or equal to $3.6 \log_{10}$ reduction at day 28 (Tables 7 and 8). For *E. coli*, there was a less than $1.0 \log_{10}$ reduction from the calculated initial concentration at day 7 and a less than $3.0 \log_{10}$ reduction at day 14 and day 28 (Tables 7 and 8).

For yeast and mold, there was a greater than or equal to $0.6 \log_{10}$ reduction from the calculated initial concentration at day 7, a greater than or equal to $1.0 \log_{10}$ reduction at day 14, and a greater than or equal to $1.6 \log_{10}$ reduction at day 28 (Tables 7 and 8).

TABLE 4
Calculated Initial Concentration of Challenge Organisms

Challenge organism	Suspension concentration (CFU/mL)	Calculated Initial Concentration (CFU/mL)
<i>P. aeruginosa</i>	7.7×10^7	3.9×10^5
<i>E. coli</i>	1.2×10^8	6.0×10^5
<i>S. aureus</i>	3.9×10^7	2.0×10^5
<i>C. albicans</i>	7.2×10^7	3.6×10^5
<i>A. niger</i>	1.2×10^8	6.0×10^5

TABLE 5
Bioburden of Sample by the Pour Plate Method

Media	CFU Recovered from 10^{-1} Sample Dilution	Bioburden (CFU/mL)
TSA	0	<10
SDA	0	<10

TABLE 6
Average Recovered Inoculum by the Pour Plate Method

Challenge Organism	Average CFU Inoculated	Average CFU Recovered from 10^{-1} dilution	Average Percent Recovery (%)
<i>P. aeruginosa</i>	65	48	74
<i>E. coli</i>	93	110	118
<i>S. aureus</i>	43	55	129
<i>C. albicans</i>	84	74	88
<i>A. niger</i>	59	46	79

5

TABLE 7
Microbial Population over 28 Days

Challenge Organisms	Initial Calculated Count (CFU/mL)	7 days (CFU/mL)	14 days (CFU/mL)	28 days (CFU/mL)
<i>P. aeruginosa</i>	3.9×10^5	6.3×10^3	1.1×10^4	50
<i>E. coli</i>	6.0×10^5	1.2×10^5	1.3×10^6	7.2×10^5
<i>S. aureus</i>	2.0×10^5	9.1×10^3	7.4×10^2	55
<i>C. albicans</i>	3.6×10^5	<100	<10	<10
<i>A. niger</i>	6.0×10^5	1.5×10^5	5.8×10^4	1.4×10^4
Negative Control	<10	<10	<10	<10

10

TABLE 8
Log Reduction of Microbial Population over 28 Days

Challenge Organisms	Log Reduction		
	7 days	14 days	28 days
<i>P. aeruginosa</i>	1.8	1.5	3.9
<i>E. coli</i>	0.7	-0.3	-0.1
<i>S. aureus</i>	1.3	2.4	3.6
<i>C. albicans</i>	>3.6	>4.6	>4.6
<i>A. niger</i>	0.6	1.0	1.6

15

Discussion

In the bacterial anti-microbial effectiveness test, this sample did not meet the USP requirements. There was a $<1.0 \log_{10}$ reduction of the calculated initial concentration at day 7 for *E. coli*. At day 14, the log reduction of all three bacterial test organisms was a $<3.0 \log_{10}$. For yeast and mold, there was no increase from the initial calculated count at 7, 14, and 28 days.

20

EXAMPLE 2Summary

Testing was performed as disclosed above for anti-microbial effectiveness to evaluate the efficacy of 0.8% benzyl alcohol as a preservative in 2 mg/mL of ACTIVASE® t-PA against the USP requirements. This sample met the requirements of the USP anti-microbial effectiveness test.

Materials, Equipment, and Procedures

The sample was ACTIVASE® t-PA (2 mg/mL) in a vial with 0.8% benzyl alcohol. Specifically, the diluent was sterile water plus the appropriate amount of benzyl alcohol for a final concentration of 0.8%.

The challenge organisms were those described in Example 1.

Media, supplies, and major equipment were the same as noted in Example 1.

The procedure used was the same as that described in Example 1 and the incubation conditions were as in Table 1. The acceptance criteria and interpretation were the same as in Example 1.

Results

The results were the same as in Table 4 and Table 5 for calculated initial concentration of challenge organisms in each test preparation (between 1×10^5 and 1×10^6 CFU/mL) and for bioburden in the sample using the Pour Plate Method (no detectable bioburden). The plate count method was validated using the Pour Plate Method. The average recovered inoculum at the 10^{-1} dilution of the sample was greater than or equal to 50% of the average of the corresponding control (Table 9). For bacteria, there was a $>3.3 \log_{10}$ reduction from the calculated initial concentration at day 7, and a $>4.3 \log_{10}$ reduction at day 14 and day 28 (Tables 10 and 11). For yeast and mold, there was a greater than or equal to $3.1 \log_{10}$ reduction from the calculated initial concentration at day 7, and a greater than $4.6 \log_{10}$ reduction at day 14 and day 28 (Tables 10 and 11).

TABLE 9
Average Recovered Inoculum by the Pour Plate Method

Challenge organism	Average CFU inoculated	Average CFU recovered from 10 ⁻¹ dilution	Average percent recovery
<i>P. aeruginosa</i>	65	60	92
<i>E. coli</i>	93	99	106
<i>S. aureus</i>	43	55	129
<i>C. albicans</i>	84	82	97
<i>A. niger</i>	59	50	85

5

TABLE 10
Microbial Population over 28 days

Challenge organisms	Initial Calculated Count (CFU/mL)	7 days (CFU/mL)	14 days (CFU/mL)	28 days (CFU/mL)
<i>P. aeruginosa</i>	3.9 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>E. coli</i>	6.0 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>S. aureus</i>	2.0 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>C. albicans</i>	3.6 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>A. niger</i>	6.0 x 10 ⁵	500	<10	<10
Negative control	<10	<10	<10	<10

10

TABLE 11
Log Reduction of Microbial Population over 28 Days

Challenge organisms	Log Reduction		
	7 days	14 days	28 days
<i>P. aeruginosa</i>	>3.6	>4.6	>4.6
<i>E. coli</i>	>3.8	>4.8	>4.8
<i>S. aureus</i>	>3.3	>4.3	>4.3
<i>C. albicans</i>	>3.6	>4.6	>4.6
<i>A. niger</i>	3.1	>4.8	>4.8

15 Conclusion

This sample met the requirements of the USP anti-microbial effectiveness test.

EXAMPLE 3

20 Summary

Testing was performed as disclosed above for anti-microbial effectiveness to evaluate the efficacy of 0.9% benzyl alcohol as a preservative in 2 mg/mL of ACTIVASE® t-PA against the USP requirements. This sample met the requirements of the USP anti-

25 microbial effectiveness test.

022
19**Materials, Equipment, and Procedures**

The sample was ACTIVASE® t-PA (2 mg/mL) in a vial with 0.9% benzyl alcohol. Specifically, the diluent was sterile water plus the appropriate amount of benzyl alcohol for a final concentration of 0.9%.

The challenge organisms were those described in Example 1.

Media, supplies, and major equipment were the same as noted in Example 1.

The procedure used was the same as that described in Example 1 and the incubation conditions were as in Table 1. The acceptance criteria and interpretation were the same as in Example 1.

Results

The results were the same as in Table 4 and Table 5 for calculated initial concentration of challenge organisms in each test preparation (between 1×10^5 and 1×10^6 CFU/mL) and for bioburden in the sample using the Pour Plate Method (no detectable bioburden). The plate count method was validated using the Pour Plate Method. The average recovered inoculum at the 10^{-1} dilution of the sample was greater than or equal to 50% of the average of the corresponding control (Table 12). For bacteria, there was a $>3.3 \log_{10}$ reduction from the calculated initial concentration at day 7, and a $>4.3 \log_{10}$ reduction at day 14 and day 28 (Tables 13 and 14). For yeast and mold, there was a greater than or equal to $3.6 \log_{10}$ reduction from the calculated initial concentration at day 7, and a greater than $4.6 \log_{10}$ reduction at day 14 and day 28 (Tables 13 and 14).

TABLE 12
Average Recovered Inoculum by the Pour Plate Method

Challenge organism	Average CFU inoculated	Average CFU recovered from 10^{-1} dilution	Average percent recovery
<i>P. aeruginosa</i>	65	58	89
<i>E. coli</i>	93	91	97
<i>S. aureus</i>	43	43	100
<i>C. albicans</i>	84	76	90
<i>A. niger</i>	59	38	65

TABLE 13
Microbial Population over 28 days

Challenge organisms	Initial Calculated Count (CFU/mL)	7 days (CFU/mL)	14 days (CFU/mL)	28 days (CFU/mL)
<i>P. aeruginosa</i>	3.9×10^5	<100	<10	<10
<i>E. coli</i>	6.0×10^5	<100	<10	<10
<i>S. aureus</i>	2.0×10^5	<100	<10	<10
<i>C. albicans</i>	3.6×10^5	<100	<10	<10
<i>A. niger</i>	6.0×10^5	<100	<10	<10
Negative control	<10	<10	<10	<10

5

TABLE 14
Log Reduction of Microbial Population over 28 Days

Challenge organisms	Log Reduction		
	7 days	14 days	28 days
<i>P. aeruginosa</i>	>3.6	>4.6	>4.6
<i>E. coli</i>	>3.8	>4.8	>4.8
<i>S. aureus</i>	>3.3	>4.3	>4.3
<i>C. albicans</i>	>3.6	>4.6	>4.6
<i>A. niger</i>	>3.8	>4.8	>4.8

10 Conclusion

This sample met the requirements of the USP anti-microbial effectiveness test.

In one suggested priming application, a solution of CATHFLO[™] ACTIVASE[®] (alteplase) 2.2.mg lyophilized powder reconstituted with 2.2 mL of 0.9% benzyl alcohol in sterile bacteriostatic water for injection (1 mg/mL concentration) can be placed inside a vascular catheter in equal volume to the catheter lumen priming volume. The solution can then be aspirated from the catheter and discarded prior to using the catheter for medical purposes.

20

EXAMPLE 4

Summary

Testing was performed as disclosed above for anti-microbial effectiveness to evaluate the efficacy of 1.0% benzyl alcohol as a preservative in 2 mg/mL of ACTIVASE[®] t-PA against the USP requirements. This sample met the requirements of the USP anti-microbial effectiveness test.

25

20
27Materials, Equipment, and Procedures

The sample was ACTIVASE® t-PA (2 mg/mL) in a vial with 1.0% benzyl alcohol. Specifically, the diluent was sterile water plus the appropriate amount of benzyl alcohol for a final concentration of 1.0%.

The challenge organisms were those described in Example 1.

Media, supplies, and major equipment were the same as noted in Example 1.

The procedure used was the same as that described in Example 1 and the incubation conditions were as in Table 1. The acceptance criteria and interpretation were the same as in Example 1.

Results

The results were the same as in Table 4 and Table 5 for calculated initial concentration of challenge organisms in each test preparation (between 1×10^5 and 1×10^6 CFU/mL) and for bioburden in the sample using the Pour Plate Method (no detectable bioburden). The plate count method was validated using the Pour Plate Method. The average recovered inoculum at the 10^{-1} dilution of the sample was greater than or equal to 50% of the average of the corresponding control (Table 15). For bacteria, there was a $>3.3 \log_{10}$ reduction from the calculated initial concentration at day 7, and a $>4.3 \log_{10}$ reduction at day 14 and day 28 (Tables 16 and 17). For yeast and mold, there was a greater than or equal to $4.1 \log_{10}$ reduction from the calculated initial concentration at day 7, and a greater than $4.6 \log_{10}$ reduction at day 14 (Tables 16 and 17).

TABLE 15
Average Recovered Inoculum by the Pour Plate Method

Challenge organism	Average CFU inoculated	Average CFU recovered from 10^{-1} dilution	Average percent recovery
<i>P. aeruginosa</i>	65	64	98
<i>E. coli</i>	93	94	101
<i>S. aureus</i>	43	43	101
<i>C. albicans</i>	84	79	94
<i>A. niger</i>	59	48	81

TABLE 16
Microbial Population over 28 days

Challenge organisms	Initial Calculated Count (CFU/mL)	7 days (CFU/mL)	14 days (CFU/mL)	28 days (CFU/mL)
<i>P. aeruginosa</i>	3.9×10^5	<100	<10	<10
<i>E. coli</i>	6.0×10^5	<100	<10	<10
<i>S. aureus</i>	2.0×10^5	<100	<10	<10
<i>C. albicans</i>	3.6×10^5	<100	<10	<10
<i>A. niger</i>	6.0×10^5	50	<10	<10
Negative control	<10	<10	<10	<10

TABLE 17
Log Reduction of Microbial Population over 28 Days

Challenge organisms	Log Reduction		
	7 days	14 days	28 days
<i>P. aeruginosa</i>	>3.6	>4.6	>4.6
<i>E. coli</i>	>3.8	>4.8	>4.8
<i>S. aureus</i>	>3.3	>4.3	>4.3
<i>C. albicans</i>	>3.6	>4.6	>4.6
<i>A. niger</i>	4.1	>4.8	>4.8

Conclusion

This sample met the requirements of the USP anti-microbial effectiveness test.

EXAMPLE 5

Summary

Testing was performed as disclosed above for anti-microbial effectiveness to evaluate the efficacy of 1.1% benzyl alcohol as a preservative in 2 mg/mL of ACTIVASE® t-PA against the USP requirements. This sample met the requirements of the USP anti-microbial effectiveness test.

Materials, Equipment, and Procedures

The sample was ACTIVASE® t-PA (2 mg/mL) in a vial with 1.1% benzyl alcohol. Specifically, the diluent was sterile water plus the appropriate amount of benzyl alcohol for a final concentration of 1.1%.

The challenge organisms were those described in Example 1.

Media, supplies, and major equipment were the same as noted in Example 1.

The procedure used was the same as that described in Example 1 and the incubation conditions were as in Table 1. The acceptance criteria and interpretation were the same as in Example 1.

Results

The results were the same as in Table 4 and Table 5 for calculated initial concentration of challenge organisms in each test preparation (between 1×10^5 and 1×10^6 CFU/mL) and for bioburden in the sample using the Pour Plate Method (no detectable bioburden). The plate count method was validated using the Pour Plate Method. The average recovered inoculum at the 10^{-1} dilution of the sample was greater than or equal to 50% of the average of the corresponding control (Table 18). For bacteria, there was a $>3.3 \log_{10}$ reduction from the calculated initial concentration at day 7, and a $>4.3 \log_{10}$ reduction at day 14 and day 28 (Tables 19 and 20). For yeast and mold, there was a greater than or equal to $3.6 \log_{10}$ reduction from the calculated initial concentration at day 7, and a greater than $4.6 \log_{10}$ reduction at day 14 and day 28 (Tables 19 and 20).

TABLE 18
Average Recovered Inoculum by the Pour Plate Method

Challenge organism	Average CFU inoculated	Average CFU recovered from 10^{-1} dilution	Average percent recovery
<i>P. aeruginosa</i>	65	61	94
<i>E. coli</i>	93	118	127
<i>S. aureus</i>	43	54	127
<i>C. albicans</i>	84	77	91
<i>A. niger</i>	59	47	79

TABLE 19
Microbial Population over 28 days

Challenge organisms	Initial Calculated Count (CFU/mL)	7 days (CFU/mL)	14 days (CFU/mL)	28 days (CFU/mL)
<i>P. aeruginosa</i>	3.9×10^5	<100	<10	<10
<i>E. coli</i>	6.0×10^5	<100	<10	<10
<i>S. aureus</i>	2.0×10^5	<100	<10	<10
<i>C. albicans</i>	3.6×10^5	<100	<10	<10
<i>A. niger</i>	6.0×10^5	<100	<10	<10
Negative control	<10	<10	<10	<10

TABLE 20
Log Reduction of Microbial Population over 28 Days

Challenge organisms	Log Reduction		
	7 days	14 days	28 days
<i>P. aeruginosa</i>	>3.6	>4.6	>4.6
<i>E. coli</i>	>3.8	>4.8	>4.8
<i>S. aureus</i>	>3.3	>4.3	>4.3
<i>C. albicans</i>	>3.6	>4.6	>4.6
<i>A. niger</i>	>3.8	>4.8	>4.8

Conclusion

This sample met the requirements of the USP anti-microbial effectiveness test.--

EXAMPLE 6

Summary

Alteplase (2 mg/vial rt-PA) was reconstituted to 1 mg/mL with BWFI, BNS, and SWFI. The stability of the protein after reconstitution in glass vials was monitored at 37°C for 2 weeks. After 14 days of storage at 37°C, all the reconstituted solutions appeared as clear and colorless. The protein concentrations (1.1 ± 0.02 mg/mL) and pH (7.2 ± 0.03) remained unchanged. The percent monomer by native SEC showed a gradual decrease by 1-3% and 4-5% after one and two weeks at 37°C, respectively. A decrease in percent single-chain and clot lysis activity (in vitro) was observed after one week at 37°C. However, the percent single-chain and clot-lysis activity (in vitro) was drastically reduced after 14 days at 37°C. More proteolytic clippings of the molecule were observed for the protein solution reconstituted with SWFI than with BWFI or BNS. Therefore, alteplase (2 mg/vial rt-PA) reconstituted with BWFI, BNS, or SWFI to 1 mg/mL was relatively stable at 37°C for one week.

Materials and Methods

A. Materials

- Alteplase (2-mg vial rt-PA)
- BWFI, USP, 20 mL (Abbott)
- Bacteriostatic 0.9% sodium chloride (w/v) (BNS) injection, USP, 20 mL (Abbott)
- SWFI, USP, 20 mL (Abbott)

B. Methods

Alteplase (2 mg/vial rt-PA) was reconstituted to 1 mg/mL with BWFI, BNS, or SWFI (in duplicate). The reconstituted protein solutions were stored at 37°C. The stability of the reconstituted protein solutions after storage for 3 hours, 7 days, and 14 days at 37°C was assessed by the assays listed below.

For particle counts by HIAC/ROYCO, a separate experiment was performed. Alteplase (2-mg rt-PA) was reconstituted with BWFI, BNS, or SWFI (in duplicate) to 1 mg/mL. Four vials per group for each time point were combined together in a single vial (original 5-mL glass vial). The particle counts (3 x 1 mL sampling, discarding the first run) were taken at T = 0, 3 hours, 7 days, and 14 days after storage at 37°C.

C. Assays

(1) Color and Clarity.. Each sample in a glass vial was examined under a light box equipped with a black and white background. The color and clarity of the sample were recorded accordingly.

(2) HIAC/ROYCO. Four vials of the reconstituted protein solution were combined for the measurement. The procedure for particulate matter analysis for small-volume parenterals was employed with the modification that a sample volume of 1 mL was tested using a 1-mL syringe instead of a 5-mL volume using a 10-mL syringe. Particle counts in the size range of ≥ 10 and ≥ 25 μm were recorded.

(3) pH. The pH of selected aliquots was determined using a RADIOMETER PHM 93TM pH meter equipped with a combination pH electrode (Microelectrodes, Inc.). The pH meter was standardized with pH 4.01 and 7.00 standard buffers (Mallinckrodt, Inc.). 20 μL of the aliquots were transferred to a 0.5-mL Eppendorf tube for measurement.

(4) Concentration by UV. The protein concentration was determined by UV absorption at 280 nm. A UV/VIS diode array spectrophotometer (HP8253A) was employed with a 1-cm path-length quartz cuvette for measurement. The samples were diluted 10 to 12.5 fold with formulation buffer. The measurement was blanked

against the proper reference and an UV scan from 240 to 400 nm was taken. The protein concentration was calculated as follows:

Conc., mg/mL = (A₂₈₀-A₃₂₀)/1.9, where 1.9 is the absorptivity (mL/mg-cm) of rt-PA at 280 nm.

5

(5) % Monomer by native SEC. A TSK 3000SWXL™ (ToSoHaas, 300 x 7.5-mm i.d., 5-μm) column was employed on a HP1090™ liquid chromatography column (LC) equipped with a Diode-Array detector. The mobile phase was 0.2M arginine, 0.12M ammonium sulfate, 10% isopropanol, pH 7.3. The flow rate was 1 mL/min. The samples (50 μg of rt-PA equivalent) were injected in singlet and the chromatograms collected with detection at 280 nm. The percent monomer is calculated as follows:

10

15

% monomer = (monomer peak area / total peak area attributed to protein) x 100

(6) % Single chain by reduced SEC. A TSK 3000SWXL™ (ToSoHaas, 300 x 7.5-mm i.d., 5-μm) column was employed on a HP1090™ LC equipped with a Diode-Array detector. The mobile phase was 0.2M sodium phosphate, 0.1% SDS, pH 6.8. The flow rate was 1 mL/min. The samples (12.5 μg of rt-PA equivalent) were incubated with 20 mM DTT (final concentration) at 37°C for 3-5 minutes and injected in singlicate. The chromatograms were monitored with detection at 214 nm. The percent single chain (SC) is calculated as follows:

20

25

% SC = (first main peak area / sum of the first and second main peak area) x 100.

(7) Purified clot lysis activity for rt-PA. The potency of the protein was assessed by the purified clot lysis assay described in Example 7 below. Samples were diluted to assay range (200-1000 ng/mL) in two concentrations with diluent. Dilutions were performed the day before the assay and diluted samples were stored at 2-8°C until analysis the next day. rt-PA reference material was diluted similarly as an internal reference.

35

Results

The results of the study are shown in Tables 21 and 22. After 14 days of storage at 37°C, all the reconstituted solutions appeared as clear and colorless. The protein concentrations (1.1 ± 0.02 mg/mL) and pH (7.2 ± 0.03) remained unchanged. Table 21

40

shows the particle counts by HIAC/ROYCO of the reconstituted alteplase (2 mg/vial rt-PA, n=1) at 1 mg/mL with BWFI, BNS, and SWFI after storage at 37°C. The table indicates an increase in particle counts (≥ 10 and 25 μm) for all protein solutions after reconstitution compared to the diluent alone. However, all the results are well within the USP limits for Small Volume Injection (SVI, see Table 23). There appeared to be a decrease in particle counts for the reconstituted drug product stored over time at 37°C. The particle counts result also showed a lower number of counts for protein solutions reconstituted with BWFI and BNS than with SWFI.

All the reconstituted solutions had 94-95% monomer remaining after 14 days at 37°C (Table 22). Both the % single chain and clot lysis activity (*in vitro*) tests showed a decrease after one week at 37°C. The % single chain is higher for the protein solutions reconstituted with BWFI or BNS than with SWFI. Without being limited to any one theory, this may be the result of the preservative inhibiting the proteolytic activity. After two weeks at 37°C, the percent single chain for the protein solutions reconstituted with SWFI dropped to equal to or less than 50%, which is below the stability specification ($\geq 55\%$) for the single chain in rt-PA.

In addition to the conversion of one chain to two chains, the reduction SEC chromatograms of the reconstituted protein solutions after two weeks at 37°C revealed clippings/fragments of the molecule, suggesting increased proteolytic cleavage at elevated temperature with time (see Figure 1). Figure 1 clearly shows that in addition to the clippings or fragments, more conversion of one-chain to two-chain rt-PA was observed in the reconstituted rt-PA with SWFI than with BWFI or BNS after storage at 37°C for 14 days.

The clot-lysis activity (*in vitro*) indicated that all the reconstituted alteplase solutions (1 mg/mL) retained greater than or equal to 100% potency after three hours at 37°C (Table 23). All samples were colorless or clear. The activity began to drop after one week of storage at 37°C, but about 90% of the activity (relative to initial, T=0) still remained. There was a drastic

reduction in activity after two weeks at 37°C, with only 44-65% activity remaining.

TABLE 21

Particle Counts by HIAC/ROYCO of Reconstituted Alteplase (1 mg/mL, 2mg/vial rt-PA) Stored at 37°C for 3 Hours, 7 Days, and 14 Days

	HIAC/ROYCO			
	> 10µm/mL	> 10 µm/vial	> 25 µm/mL	> 25 µm/vial
T=0: BWFI	89	196	5.5	12
rt-PA/BWFI	725.5	1596	7	15
T=0: BNS	50	110	7	15
rt-PA/BNS	474.5	1044	8.5	19
T=3 h, 37°C BWFI	1	2	0	0
rt-PA/BWFI	474	948	3.5	8
T=3 h, 37°C BNS	10.5	23	0	0
rt-PA/BNS	200	440	1	2
T=0: SWFI	10.5	23	0	0
rt-PA/SWFI	603	1327	10.5	23
T=0: BWFI	2.5	6	0	0
rt-PA/BWFI	877.5	1931	18.5	41
T=0: BNS	2	4	0	0
rt-PA/BNS	225	495	2.5	6
T=7 d, 37°C: SWFI	13.5	30	0	0
rt-PA/SWFI	302.5	666	0	0
T=7 d, 37°C BWFI	302.5	4	0	0
rt-PA/BWFI	2	292	1	2
T=7 d, 37°C BNS	2	4	0	0
rt-PA/BNS	32.5	72	0.5	1
T=0: SWFI	6.5	14	0	0
rt-PA/SWFI	796.5	1752	6	13
T=0: BWFI	4.5	10	0	0
rt-PA/BWFI	564	1241	13.5	30
T=0: BNS	1	2	0	0
rt-PA/BNS	587	1291	4	9
T = 14 d, 37°C: SWFI	4.5	10	0	0
rt-PA/SWFI	491	1080	2.5	6
T = 14 d, 37°C: BWFI	1.3	3	0	0
rt-PA/BWFI	56.3	124	3	7

T = 14 d, 37°C: BNS rt-PA/BNS	0.5 55	1 121	0 0	0 0
--	-----------	----------	--------	--------

TABLE 22

Stability of Reconstituted Alteplase (2 mg/vial rt-PA) to 1 mg/mL with BWFI, BNS, and SWFI in Glass Vials at 37°C

		pH	Conc. (by SEC) mg/mL	Na- tive SEC (%) mono- mer)	Re- duced SEC (% SC)	Clot lysis		
						(mg/mL)	(x 10 ³ IU/mg)	Rela- tive % activ- ity*
T=0: rtPA/ BWFI	A	7.23	1.11	98.7	85.5	0.97+0.02	5.07	100
	B	7.24	1.11	98.6	85.5	1.00+0.01	5.23	100
T=0: rtPA/ BNS	A	7.18	1.11	98.4	85.5	1.03+0.02	5.38	100
	B	7.19	1.09	98.3	85.5	0.99+0.05	5.27	100
T=0: rtPA/ SWFI	A	7.26	1.10	98.3	85.5	1.07+0.02	5.64	100
	B	7.25	1.10	98.2	85.4	1.04+0.04	5.48	100
T=3 h, 37°C: rtPA/ BWFI	A	7.24	1.12	98.3	85.2	1.08+0.005	5.59	110
	B	7.25	1.08	98.2	98.3	1.01+0.035	5.42	104
T=3 h, 37°C: rtPA/ BNS	A	7.18	1.11	98.0	85.3	1.07+0.01	5.59	104
	B	7.20	1.10	97.9	85.3	1.04+0.015	5.48	104
T=3 h, 37°C: rtPA/ SWFI	A	7.25	1.11	98.2	85.2	1.04+0.04	5.43	96
	B	7.25	1.10	98.1	85.2	1.11+0.035	5.85	107
T=7 d, 37°C: rtPA/ BWFI	A	7.25	1.12	95.9	72.8	0.86+0.03	4.45	88
	B	7.26	1.11	96.2	73.0	0.92+0.025	4.81	92
T=7 d, 37°C: rtPA/ BNS	A	7.20	1.10	96.9	75.1	0.91+0.045	4.80	89
	B	7.20	1.07	97.0	74.9	0.89+0.005	4.82	91
T=7 d, 37°C: rtPA/ SWFI	A	7.28	1.11	97.5	68.7	1.00+0.03	5.23	93
	B	7.27	1.12	97.2	67.6	0.94+0.01	4.87	89
T=14d 37°C: rtPA/ BWFI	A	7.26	1.10	94.5	58.0	0.56+0.02	2.95	58
	B	7.27	1.09	93.8	58.4	0.57+0.03	3.03	58

T=14d 37°C: rtPA/ BNS	A	7.22	1.11	94.0	62.2	0.62±0.015	3.24	60
	B	7.22	1.10	93.9	62.1	0.62±0	3.27	62
T=14d 37°C: rtPA/ SWFI	A	7.31	1.16	94.0	49.2	0.73±0	3.65	65
	B	7.29	1.16	93.9	49.0	0.48±0.01	2.40	44

* % Activity (IU/mg) relative to initial (T=0).

5

TABLE 23
Limits for Particulate Matter in Injections

Small-volume Injections, SVI (per container basis):	> 10 µm	> 25 µm
Light obscuration	6000	600
Microscopic	25	3

Conclusion

10 Alteplase (2 mg/vial rt-PA) reconstituted with BWFI, BNS, or
SWFI to 1 mg/mL was relatively stable at 37°C for one week in a
glass vial. It is believed that the BNS solution would be anti-
microbial, since it is the benzyl alcohol that is the active
ingredient. Stability testing using BNS was positive, i.e.,
15 alteplase was stable and functional.

EXAMPLE 7

Summary

20 T-PA diluted down to 0.01 mg/mL in normal saline was found to
be lytically active in a clot lysis effectiveness test. In such
test, thrombin and fibrinogen are mixed together to produce
fibrin; plasminogen and rt-PA are mixed together to produce
plasmin; and together the fibrin and plasmin lyse the clot. The
test measures the effectiveness of t-PA to act with plasminogen to
25 form plasmin and thus lyse the clot.

Materials and Methods

A. Materials:

30 Alteplase (2 mg/vial rt-PA) was diluted to a concentration of
0.01, 0.025, 0.05, and 0.1 mg/mL final protein concentration in
0.9% NaCl (Normal Saline, NS)-containing IV bags (Baxter and/or
Abbott, 250 mL). Specifically, rt-PA, protein bulk, was diluted
to 1 mg/mL (50- mg vial formulation equivalent, 0.004% TWEEN 80™

surfactant) with filtered MILLI-Q™ water, or a 100-mg vial rt-PA was reconstituted to 1 mg/mL (0.008-0.011% TWEEN 80™ surfactant) with Sterile Water for Injection, USP (SWFI) using a 60-cc BD syringe and an 18G needle directly inserted into the rubber septum of the vial at the center of the cake. The vial was gently mixed by slow inversions or rolling action until the cake was totally dissolved. IV diluent (0.9% NaCl, NS) was withdrawn and replaced with the same amount of the reconstituted or diluted 1 mg/mL rt-PA as follows:

Final Conc. (mg/mL)	Vol. (mL) removed from a 250-mL IV bag* (Then replaced with same vol. of 1 mg/mL rt-PA)
0.05	12.5 (30-cc BD syringe and 18G needle)
0.024	6 (10-cc BD syringe and 22G needle)
0.01	2.5 (3- or 5-cc BD syringe and 22G needle)

• Overfill of bag was not accounted for.

After dilution into the IV bags (n=2 for each concentration), the bags were gently mixed by inversion (about 20-24 times). A 10-mL aliquot was withdrawn from the inlet port of the IV bag using a 10-cc BD syringe and 22G needle. An aliquot (t=0) was dispensed directly into a 20-cc Type I clear glass vial for visual inspection. Similarly, placebo equivalents at 0.025 and 0.05 mg/mL were also physically examined.

B. Assays:

1. Visual Inspection

Each aliquot was examined under a light box equipped with a black and white background. The aliquots were compared to an equal volume of SWFI or filtered MILLI-Q™ water in a same-size glass vial that served as a control. The color and clarity of the aliquots were recorded accordingly.

2. Purified Clot Lysis Test (Microcentrifugal Analyzer (Test 1) and Plate Reader (Test 2)):

The potency of the alteplase t-PA protein was assessed by the purified clot lysis assay described below. Samples were diluted

to assay range (200-1000 ng/mL) in three or two concentrations with diluent. Dilutions were performed the day before the assay and diluted samples were stored at 2-8°C until analysis the next day. Rt-PA reference material was diluted similarly as an internal reference.

a. Equipment:

IL MONARCH Microcentrifugal Analyzer model no. 761™ was used, consisting of an analyzer assembly with fluorescence and light-scattering capability and built-in computer, and a loader assembly.

b. Reagents:

-1% (v/v) POLYSORBATE 80™ emulsifier(JT Baker).

-Assay buffer: 0.06 M sodium phosphate (0.0114 F $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.0486 F Na_2HPO_4) with 0.02% (w/v) NaN_3 and 0.01% (v/v) POLYSORBATE 80™ emulsifier, pH 7.4 $\pm$ 0.1.

-Human thrombin (30-40 units/mL) (Calbiochem) kept in an unopened vial frozen at or below -60°C until ready for use.

-Plasminogen kept frozen at or below -60°C until use.

-Biocell fibrinogen prepared as follows: Fibrinogen and clot lysis buffer were brought to room temperature. A total of 7 mL of clot lysis buffer was added to the vial. The vial was capped and parafilm. The vial was placed on its side in a dish or taped to an orbital shaker. The speed was set between 4 and 5. The vial was shaken for up to one hour, while it was checked to see how well the cake was dissolving. When the cake was completely dissolved, the solution was transferred to a 50-mL Falcon tube. The vial was rinsed at least three times with clot lysis buffer, and the rinses were transferred into a Falcon tube to catch any residual globules or particles. The solution was brought to a final volume of 30 mL using the markings on the tube. The tube was parafilm and put on the shaker for 15-30 minutes. All protein was solubilized after shaking. The solution was set on wet ice for at least 2-3 hours and gently shaken periodically. Using WHATMAN™ No. 1 paper, the solution was filtered by decanting the solution away from the precipitate. The filtered solution was kept on ice.

-Reference material (standard ACTIVASE[®] t-PA). All solutions containing t-PA were kept in polystyrene or polypropylene containers.

c. Preparation of Standards:

Starting with the reference material, a 10- μ g/mL standard stock solution was prepared. The dilution was recorded on assay data sheets. The remaining standards were prepared according to the following dilution scheme. All standards were kept on ice and the expiration of the standard curve was 12 hours from the time of preparation.

Standard	rt-PA Source	Assay Buffer
200 ng/mL	200 μ L of standard stock	9.8 mL
400 ng/mL	400 μ L of standard stock	9.6 mL
600 ng/mL	600 μ L of standard stock	9.4 mL
800 ng/mL	800 μ L of standard stock	9.2 mL
1000 ng/mL	1000 μ L of standard stock	9.0 mL

The preparation of standard stock solution and of remaining standards was repeated to prepare two standard curves.

d. Preparation of Sample:

i. Initial preparation

If the sample was a final vial of lyophilized material, it was reconstituted volumetrically to 1 mg/mL with water for injection (WFI). If the sample was a sterile bulk material, it was diluted to 1 mg/mL with WFI.

ii. Sample stock preparation

Using a micropipet, 100 μ L of the 1.0-mg/mL rt-PA sample was pipetted into a 15-mL polystyrene tube. A total of 9.90 mL of assay buffer was added to the tube using a 10-mL graduated polystyrene pipette or volumetric pipette plus micropipette. This solution was designated as the sample stock solution.

iii. Working sample preparation

Using a micropipet, 600 μ L of the sample stock solution was pipetted into a 15-mL polystyrene tube. 9.40 mL of assay buffer was added to the tube using a 10-mL graduated polystyrene pipette, or volumetric pipette plus micropipette. This was the sample

solution to load into the sample cups. The diluted samples were kept on ice.

iv. The sample stock preparation and working sample preparation steps were repeated to prepare two sample dilutions.

v. Positive assay control preparation

The control was prepared by reconstituting a sample of rt-PA to 1 mg/mL, pipetting 0.5-mL aliquots into Eppendorf tubes, and freezing at -60°C. A new tube was thawed on each day the assay was run. The control was diluted using 100 µL of sample in the same manner as the sample. The diluted control samples were kept on ice.

e. Procedure for MONARCH 2000™ Analyzer (Assay 1):

The assay works as follows: Reagents are substances added to a solution of another substance to participate in a chemical reaction. In this case, contents of boat 1 will react with contents of boat 2 to form a standardized clot. Thrombin (boat 2), when mixed with plasminogen and fibrinogen (boat 1), causes the conversion of fibrinogen to fibrin and forms a standardized in vitro clot consisting of plasminogen and fibrin. A test sample of t-PA is then exposed to the clot. T-PA causes the conversion of plasminogen to plasmin, and plasmin then breaks apart the fibrin strands. As the clot breaks apart, there is a change in the absorbance (light) characteristics. The absorbance is plotted versus time.

The pipette tips of the analyzer were checked to ensure they were properly aligned, and the water reservoir was checked to be sure that it was full. Syringes were debubbled if necessary and the wash cycle was performed.

The analyzer parameters were as shown in Table 24.

Table 24
Analyzer Parameters

Identification Parameters	
Test code	24
Test name	General absorbance
Test mnemonic	GNABS
Optical mode	Absorbance
Loading Parameters	
Loading type	Load (Crit.) incubate analyze
Reagent blank	on

Reference type	diluent
Sample volume	20 μ L
Sample diluent	0 μ L
Reagent diluent	0 μ L
1st reagent	200 μ L
2nd reagent	20 μ L
1st Reagent bar code	T1
2nd Reagent bar code	T2
Data Acquisition Parameters	
Analysis type	Mix Run
Temperature	37°C
Incubate time	5 min.
Delay time	280 sec*
Interval time	5 sec*
No. of data points	90*
Filter 1	340 nm
Filter 2	340 nm
Monochromator 1	340 nm
Monochromator 2	340 nm

*These items should be adjusted accordingly to ensure full data acquisition.

5 Reagent boat 1 was prepared by adding 200 μ L of reconstituted plasminogen to 10.0 mL of filtered fibrinogen. This was mixed gently and put into reagent boat 1. The reagent boat 1 was placed into the first position of the analyzer reagent table.

10 Reagent boat 2 was prepared by adding the 33 units/mL thrombin solution described above to reagent boat 2. Reagent boat 2 was placed into position 2 in the analyzer.

15 The 0.25-mL sample cups were placed in the sample ring. Using disposable transfer pipettes or a PIPETMAN™ pipette, the sample cups were filled with standard, control, and samples as indicated in Table 25, Suggested Loading Scheme. If fewer than two samples were being run, the loading was done as indicated and the assay buffer or water was pipetted into any intervening empty sample cups.

20 Table 25
Suggested Loading Scheme

Sample ID	Cup No.	Cuvette No.
200 ng/mL Standard (I)	1	3
400 ng/mL Standard (I)	2	4

600 ng/mL Standard (I)	3	5
800 ng/mL Standard (I)	4	6
1000 ng/mL Standard (I)	5	7
assay control rep 1	6	8
200 ng/mL Standard (II)	7	9
sample 1 dil 1 rep 1	8	10
sample 1 dil 2 rep 1	9	11
sample 2 dil 1 rep 1	10	12
sample 2 dil 2 rep 1	11	13
assay control rep 2	12	14
400 ng/mL Standard (II)	13	15
sample 1 dil 1 rep 2	14	16
sample 1 dil 2 rep 2	15	17
sample 2 dil 1 rep 2	16	18
sample 2 dil 2 rep 2	17	19
assay control rep 3	18	20
600 ng/mL Standard (II)	19	21
sample 1 dil 1 rep 3	20	22
sample 1 dil 2 rep 3	21	23
sample 2 dil 1 rep 3	22	24
sample 2 dil 2 rep 3	23	25
assay control rep 4	24	26
800 ng/mL Standard (II)	25	27
sample 1 dil 1 rep 4	26	28
sample 1 dil 2 rep 4	27	29
sample 2 dil 1 rep 4	28	30
sample 2 dil 2 rep 4	29	31
assay control rep 5	30	32
1000 ng/mL Standard (II)	31	33
sample 1 dil 1 rep 5	32	34
sample 1 dil 2 rep 5	33	35
sample 2 dil 1 rep 5	34	36
sample 2 dil 2 rep 5	35	37

The "Special request" button was pressed on the MONARCH™ Analyzer. The sample cup information was entered. The "Accept" button was pressed twice. After the MONARCH™ Analyzer finished pipetting, the reagent boats were removed and placed on ice. The sample ring was removed and placed in the refrigerator at 2-8°C.

i. Endpoint Determination:

The endpoint (lysis time) may be determined by a computer program or manually. For automatic calculation by computer, the endpoint is the time required to lyse the clot, which is

determined automatically. For manual endpoint determination, the endpoint is defined as the first time point below 0.03 absorbance units where the change is less than 0.003 abs unit. Specifically, for manual determination, the endpoint was determined from the absorbance time data. The first absorbance point less than 0.0300 was located. The endpoint was determined as the time of the first absorbance value less than 0.0300 if the change in absorbance between the current absorbance and the subsequent absorbance was less than 0.0030. If the delta absorbance was greater than 0.0030, one moved to the next absorbance reading and determined the delta absorbance. The endpoint was the first absorbance value of the pair (initial and subsequent absorbance value) where the delta absorbance was less than 0.0030.

ii. Calculations:

The mean lysis time for each standard curve point was calculated. The standard concentrations (ng/mL) and the mean endpoint times (which are in seconds) were converted to log values. A standard curve of log concentration (x-axis) versus log time (y-axis) was prepared.

Using the slope and intercept values obtained from the linear regression analysis, the log concentration for each sample was calculated from the log lysis time (endpoint). The antilog of the obtained log concentration was taken and multiplied by the dilution factor (e.g., 1667) to obtain units/mL.

$$*(\text{units/mL}) = \text{antilog} \left[\frac{[\log \text{ lysis time} - y\text{-intercept}]}{\text{slope}} \right] \times \frac{1 \text{ mg}}{1,000,000 \text{ ng}} \times$$

X (sample dilution) X (1 unit/mg).

The system suitability of the standard curve was evaluated using the system suitability test. For a determination to be valid under this test, the correlation coefficient for the standards must be between -0.997 and -1.000, and the control within $\pm 10\%$ of its accepted value. If system suitability was not met, the standard curve could be redefined by performing the linear regression analysis using no

fewer than four contiguous points (i.e., the first or last standard may be omitted).

The results were reported as units/vial, units/mg, units/mL, IU/vial, IU/mg, or IU/mL, as required. For the control, all five replicates were averaged. System suitability was assessed as described above. For final vial samples, all five replicates per sample dilution were averaged. The average result was reported from the two sample dilutions. This was reported in units/vial, where units/vial = average units/mL x mL/vial. For bulk samples, the five replicates per sample dilution were averaged. The average result was reported from the two sample dilutions. The report was in units/mg where:

$$\begin{array}{lcl} \text{*specific activity} & & \text{units of activity mL} \\ \text{(units/mg)} & = & \text{mg of protein/mL} \end{array}$$

*Units/mL or units/mg may be converted to international units (IU)/mL or IU/mg by multiplication by the appropriate international unit conversion factor.

For COA and stability testing, the testing of the sample was repeated using one rotor per each of three days. The average of the results from the three days was reported. The assay may be repeated based on the results of the in-house control and/or based on determinate or indeterminate error. The final results may be reported as an average of multiple tests.

f. Procedure for the Plate Reader Assay 2:

The plate reader was turned on and the temperature of the thermostat was set to 25°C. The lamp was allowed to warm up for at least half an hour. Thrombin was added in an amount of 20 µL to each well. Thrombin may be added from a reagent reservoir or from an interim plate using the multichannel pipette. 20 µL per well of diluted standards (in duplicate) was added to wells B2-B6 and C2-C6. 20 µL per well of the control was added to wells D2-G2, and 20 µL of the samples was added into the remaining wells in quadruplicate in a vertical format to a maximum of nine samples per plate. Wells in rows B-G not containing standards, controls, or samples should contain 20 µL of assay diluent. The rt-PA

samples may be added individually with a single channel pipette or from an interim plate using the multichannel pipette.

29

Suggested Plate Map

5

200 ng Std	400 ng Std	600 ng Std	800 ng Std	1000 ng Std	Assay Dil	Assay Dil	Assay Dil	Assay Dil	Assay Dil
200 ng Std	400 ng Std	600 ng Std	800 ng Std	1000 ng Std	Assay Dil	Assay Dil	Assay Dil	Assay Dil	Assay Dil
Con- trol	Sam- ple 1	Sam- ple 2	Sam- ple 3	Sam- ple 4	Sam- ple 5	Sam- ple 6	Sam- ple 7	Sam- ple 8	Sam- ple 9
"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
"	"	"	"	"	"	"	"	"	"

10 The fibrinogen solution was allowed to reach room temperature prior to the addition of plasminogen. 200 μ L per well of fibrinogen-plasminogen was added to the plate as rapidly as possible across the plate.

15 After the addition of fibrinogen-plasminogen, the plate was placed immediately into the plate reader and data collection was begun. The first reading was taken with two minutes of adding the fibrinogen-plasminogen to the plate, so that the maximal absorbance of the clot was recorded.

The absorbance of the plate at 340 nm was collected, and read at an appropriate time interval (usually 30 seconds) until baseline absorbance for all wells was achieved (usually one hour).

i. Calculation:

20 The endpoint determination (time to half-maximal lysis) was made as follows: Lysis times were calculated as the time for the absorbance to reach the half-maximal absorbance. The maximal absorbance corresponded to the maximal clot opacity recorded for that well. The background absorbance corresponded to the minimum
25 absorbance of the totally lysed clot. The raw data points (lysis times in seconds) were averaged for each of the standard, control, and sample replicates. The log of the averaged value was calculated.

A standard curve was plotted by entering the data from lysis times (log seconds - y-axis) versus the rt-PA standard curve protein concentration (log ng/mL - x-axis).

Using the slope and intercept values obtained from the linear regression analysis, the log concentration was calculated for each sample from the log lysis time. The antilog of the obtained log concentration was taken and multiplied by the dilution factor (e.g., 1667) to obtain units/mL.

$$*(\text{units/mL}) = \text{antilog} \left[\frac{(\text{log lysis time} - \text{y-intercept})}{\text{slope}} \right] \times \frac{1 \text{ mg}}{1,000,000 \text{ ng}} \times$$

X (sample dilution) X (1 unit/mg).

For final vial sampling, units were reported in units/vial, where:

$$\text{units/vial} = \text{average units/mL} \times \text{mL/vial}.$$

If a specific activity was required for sterile bulk samples, the average of all five replicates in units/mg were reported, where:

$$*\text{specific activity} \quad (\text{units/mg}) \quad = \quad \frac{\text{units of activity mL}}{\text{mg of protein/mL}}$$

*Units/mL or units/mg may be converted to international units (IU)/mL or IU/mg by multiplication by the appropriate international unit conversion factor.

System suitability was determined. For a determination to be valid, the correlation coefficient for the standards must be between -0.995 and -1.000, and the control within + 10% of its accepted value. If system suitability was not met, the standard curve could be redefined by running the calculation program again using no fewer than four contiguous points (i.e., the first or last standard may be omitted).

The rt-PA activity was reported as units/vial, units/mg, units/mL, IU/vial, IU/mg, or IU/mL, as required on the assay data sheet. The assay may be repeated based on the results of the in-house control and/or based on determinate or indeterminate error. The final results may be reported as an average of multiple tests.

30
h**Results**

By visual inspection the alteplase t-PA diluted to 0.01, 0.025, and 0.05 mg/mL with NS appeared as colorless, clear to slightly opalescent solutions initially and after 24 hours of infusion (with no filter) at room temperature. At 0.1 mg/mL in NS, alteplase t-PA appeared as a slightly cloudy solution immediately after dilution and remained as such throughout the infusion period.

In the majority of cases, all fractions collected over 24 hours for all concentrations demonstrated specific activities greater than 90% as assessed by the clot-lysis activity assay.

Conclusion

Recovered t-PA (5 mg/mL) diluted to 0.01, 0.02, and 0.05% mg/mL in 0.9% NaCl IV bags (500 mL) was lytically active after 24 hours of storage at ambient conditions.

EXAMPLE 8**Summary**

Tenecteplase diluted down to 0.01 mg/mL in normal saline was found to be lytically active in a clot lysis effectiveness test. In such test, thrombin and fibrinogen are mixed together to produce fibrin; plasminogen and tenecteplase are mixed together to produce plasmin; and together the fibrin and plasmin lyse the clot. The test measures the effectiveness of tenecteplase to act with plasminogen to form plasmin and thus lyse the clot.

Materials and Methods**A. Materials and Chemicals**

- *Tenecteplase, TNKASE™, 50 mg vial
- *0.9% NaCl injection, USP, 500 mL (Baxter)
- *10 mL SWFI, USP (Abbott)
- *3-cc, 5-cc, and 10-cc BD syringes
- *22G 1.5 needles
- *5-cc WHEATON™ Type I clear glass vials
- *20-mm gray butyl rubber liquid stoppers

B. Methods

Tenecteplase (TNKASE™ variant of t-PA), obtained from Genentech, Inc. (e.g., U.S. Pat. No. 5,612,029) (50 mg/vial) was

reconstituted to 5 mg/mL with 10 mL of SWFI. Using a 3 & 5 cc syringe and 22G needle, 1, 2, and 5 mL of normal saline (NS) was removed from separate IV bags (500 mL NS, Baxter), in duplicates. The same volume was replaced with the reconstituted drug product to give a final tenecteplase concentration inside the bags of 0.01, 0.02, and 0.05 mg/mL. The bags were then mixed gently by inversions. A 10-mL aliquot of the diluted tenecteplase solution was sampled via the IV port with a 10-cc syringe and dispensed into two 5-cc clean clear glass vials (6 mL in one and the remaining in the other). The IV bags containing the diluted tenecteplase were placed on a bench top under normal fluorescent light at ambient conditions for 24 hours. Additional aliquots (10 mL each) from these IV bags were sampled after 8 and 24 hours of storage.

C. Assays

The pH determination was performed using a RADIOMETER PHM 93™ pH meter and a microelectrode (MI-410™, Microelectrode, Inc.). The pH meter was standardized with pH 4.01 and 7.00 buffer standards prior to measurement at ambient conditions.

All the aliquots of tenecteplase were subjected to the clot lysis assay described above to determine the in vitro bioactivity of tenecteplase in these aliquots. The samples were diluted to two or three different concentrations within assay range (200-500 ng/mL) with the diluent. Tenecteplase was used as an internal reference. All values obtained were normalized to the tenecteplase reference material. The bioactivity was assayed by clot lysis before and after centrifugation.

Results

A summary of the results is shown in Table 26. The observed pH (7.1-7.2) for the higher tenecteplase concentration (0.05 mg/mL in NS) was slightly higher than that for the lower concentrations (pH 6.7-6.8 and pH 6.8-6.9 at 0.01 and 0.02 mg/mL, respectively). This is due to the larger amount of the buffered tenecteplase (5 mg/mL, pH 7.3) being added to the IV bag directly for initial dilution. But all the pH values remained unchanged after 24 hours of storage at ambient conditions.

31
The clot lysis activity and protein concentrations (determined by RP-HPLC) were performed before and after centrifugation of each sample aliquot. This was to ensure that any precipitation that was not visible to the naked eye was removed prior to assay for more accurate interpretation of the results. In all cases, the results after centrifugation were slightly lower for both activity and concentration than before centrifugation, suggesting a small amount of precipitation occurred. Table 26 shows the percent change in concentration before and after centrifugation, which indicates the loss of protein is higher at 0.01 and 0.02 mg/mL initially soon after dilution than at higher concentration (0.5 mg/mL). This percent change at lower concentration (0.01 mg/mL) also increased with time of storage. At 0.01 mg/mL, the percent change in concentration was 57% immediately after dilution and increased to 71% after 24 hours. No significant change was observed at 0.02 and 0.05 mg/mL. This observation can be explained, without being limited to any one theory, by a more pronounced protein adsorption at a lower concentration that usually occurs instantly and saturates with time.

Table 27 shows that the percent-protein recovery relative to the targeted concentrations at 0.01, 0.02, and 0.05 mg/mL was 40-50%, 65%, and 86-92%, respectively. This percent recovery was under-estimated because the overfill volume inside the IV bag was not accounted for and the protein recovered would be at least 10% lower than the expected target concentrations (assuming 10% overfill in the IV bag).

The clot lysis activity of the recovered protein (after centrifugation) did not change significantly upon 24 hours of storage at ambient conditions. The overall percent specific activity of the recovered protein at 0.01, 0.02, and 0.05 mg/mL was $\geq 100\%$, $\geq 92\%$, and $\geq 80\%$, respectively (Table 27).

Table 26
Stability Summary of Tenecteplase Dilutions into 0.9% NaCl IV Bags
(500 mL)

Time	Targeted Conc.* (mg/mL)	pH	Clot lysis (-cent) (mg/mL)	Clot lysis (+cent) (mg/mL)	Conc.** (-cent) (mg/mL)	Conc.** (+cent) (mg/mL)	% Change in Conc. (+cent)
T=0	0.01	6.70	0.006	0.004	0.007	0.004	57
T=0	0.01	6.73	0.006	0.004	0.007	0.004	57
T=0	0.02	6.83	0.015	0.012	0.017	0.013	76
T=0	0.02	6.93	0.015	0.012	0.017	0.013	76
T=0	0.05	7.12	0.040	0.037	0.048	0.045	94
T=0	0.05	7.15	0.041	0.036	0.047	0.046	98
T=8 hours ambient	0.01	-	0.007	0.005	0.007	0.004	57
T=8 hours ambient	0.01	-	0.008	0.006	0.008	0.005	63
T=8 hours ambient	0.02	-	0.015	0.012	0.016	0.013	81
T=8 hours ambient	0.02	-	0.013	0.012	0.016	0.013	81
T=8 hours ambient	0.05	-	0.039	0.034	0.047	0.045	96
T=8 hours ambient	0.05	-	0.039	0.037	0.047	0.045	96
T=24 hours ambient	0.01	6.77	0.007	0.005	0.007	0.005	71
T=24 hours ambient	0.01	6.71	0.007	0.006	0.007	0.005	71
T=24 hours ambient	0.02	6.86	0.015	0.013	0.016	0.013	81
T=24 hours ambient	0.02	6.90	0.016	0.012	0.016	0.013	81
T=24 hours ambient	0.05	7.10	0.043	0.040	0.0480	0.043	90
T=24 hours ambient	0.05	7.07	0.043	0.040	0.0460	0.044	96

5 * Targeted concentration. Overfill in IV bags was not accounted for.

** Concentration by RP-HPLC.

-cent = before centrifugation

+cent = after centrifugation

Table 27

Bioactivity, % Protein Recovery, and % Specific Activity of Diluted Tenecteplase Upon Storage

Time	Conc.* (mg/mL)	Conc.** (+cent) (mg/mL)	% Protein Recovery (of targeted conc.)	Clot lysis (+cent) (mg/mL)	% Specific Activity
T=0	0.01	0.004	40	0.004	100
T=0	0.01	0.004	40	0.004	100
T=0	0.02	0.013	65	0.012	92
T=0	0.02	0.013	65	0.012	92
T=0	0.05	0.045	90	0.037	82
T=0	0.05	0.046	92	0.036	78
T=8 hours ambient	0.01	0.004	40	0.005	125
T=8 hours ambient	0.01	0.005	50	0.006	120
T=8 hours ambient	0.02	0.013	65	0.012	92
T=8 hours ambient	0.02	0.013	65	0.012	92
T=8 hours ambient	0.05	0.045	90	0.034	76
T=8 hours ambient	0.05	0.045	90	0.037	82
T=24 hours ambient	0.01	0.005	50	0.005	100
T=24 hours ambient	0.01	0.005	50	0.006	120
T=24 hours ambient	0.02	0.013	65	0.013	100
T=24 hours ambient	0.02	0.013	65	0.012	92
T=24 hours ambient	0.05	0.043	86	0.040	93
T=24 hours ambient	0.05	0.044	88	0.040	91

* Targeted concentration. Overfill in IV bags was not accounted for.

** Concentration by RP-HPLC
+cent = after centrifugation

% Protein recovery = [Conc. (+cent), mg/mL / Targeted conc., mg/mL] x 100%

% Specific Activity = [Clot lysis (+cent), mg/mL / Conc. (+cent), mg/mL] x 100%

Conclusion

As with t-PA as noted above, recovered tenecteplase (5 mg/mL) diluted to 0.01, 0.02, and 0.05% mg/mL in 0.9% NaCl IV bags (500

mL) was lytically active after 24 hours of storage at ambient conditions.

The aforescribed compositions and preparations are expected to be effective in preventing the adherence and colonization of catheter surfaces by infectious organisms such as *S. aureus*, *S. epidermidis*, and fungi.

33
X
M

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A composition useful for removal of fibrin-bound blood clots from a catheter comprising water, a fibrinolytically effective amount of a plasminogen activator, and a preservatively effective amount of a bacteriostatic organic alcohol, wherein the composition does not comprise a chelating agent.
2. The composition of claim 1 wherein the plasminogen activator is a tissue-plasminogen activator or a urokinase.
3. The composition of claim 2 wherein the plasminogen activator is native-sequence t-PA, native-sequence urokinase, reteplase, or tenecteplase.
4. The composition of claim 3 wherein the plasminogen activator is native-sequence t-PA or tenecteplase.
5. The composition of any one of claims 1-4 wherein the organic alcohol is benzyl alcohol, isopropanol, or ethanol.
6. The composition of any one of claims 1-5 wherein the organic alcohol is benzyl alcohol.
7. The composition of any one of claims 1-6 wherein the fibrinolytically effective amount of plasminogen activator is from about 0.1 to 10 mg/mL and the preservatively effective amount of organic alcohol is from about 0.5 to 1.2% (v/v).
8. The composition of any one of claims 1-7 wherein the fibrinolytically effective amount of plasminogen activator is from about 0.3 to 4 mg/mL.
9. The composition of any one of claims 1-8 wherein the water containing the alcohol is bacteriostatic water for injection or is bacteriostatic normal saline.

10. A method for removing fibrin-bound blood clots from a catheter that contains such blood clots comprising contacting the catheter with the composition of any one of claims 1-9 for at least about 5 days.

5

11. The method of claim 10 wherein the catheter is contacted with the composition for about 6 to 15 days.

10

12. A catheter coated with the composition of any one of claims 1-9.

13. The catheter of claim 12 that is an indwelling catheter.

15

14. A multi-compartment package comprising a compartment comprising a fibrinolytically effective amount of a plasminogen activator, a compartment comprising water containing a preservatively effective amount of a bacteriostatic organic alcohol, wherein neither compartment comprises a chelating agent, and instructions for mixing the contents of both compartments and for using the resulting mixture to remove fibrin-bound blood clots from a catheter that contains such blood clots.

20

15. The package of claim 14 wherein the plasminogen activator is a tissue-plasminogen activator or a urokinase.

25

16. The package of claim 15 wherein the plasminogen activator is native-sequence t-PA, native-sequence urokinase, reteplase, or tenecteplase.

30

17. The package of claim 16 wherein the plasminogen activator is native-sequence t-PA or tenecteplase.

35

18. The package of any one of claims 14-17 wherein the organic alcohol is benzyl alcohol, isopropanol, or ethanol.

34
K
M

19. The package of any one of claims 14-18 wherein the organic alcohol is benzyl alcohol.

20. The package of any one of claims 14-19 wherein the
5 fibrinolytically effective amount of plasminogen activator is
 from about 0.1 to 10 mg/mL and the preservatively effective
 amount of organic alcohol is from about 0.5 to 1.2% (v/v).

21. The package of any one of claims 14-20 wherein the
10 fibrinolytically effective amount of plasminogen activator is
 from about 0.3 to 4 mg/mL.

22. The package of any one of claims 14-21 that is a kit, wherein
15 each compartment is a separate container or the package is a
 multi-compartment syringe.

23. The package of any one of claims 14-22 wherein the water
 containing the alcohol is bacteriostatic water for injection or
 is bacteriostatic normal saline.

24. A multi-compartment package comprising a compartment
 comprising from about 0.1 to 10 mg/mL of native-sequence t-PA
 or tenecteplase and a compartment comprising water containing
 from about 0.5 to 1.2% (v/v) of benzyl alcohol, isopropanol, or
25 ethanol, wherein neither compartment comprises a chelating
 agent, and instructions for mixing the contents of both
 compartments and for using the resulting mixture to remove
 fibrin-bound blood clots from a catheter that contains such
 blood clots.

35
26

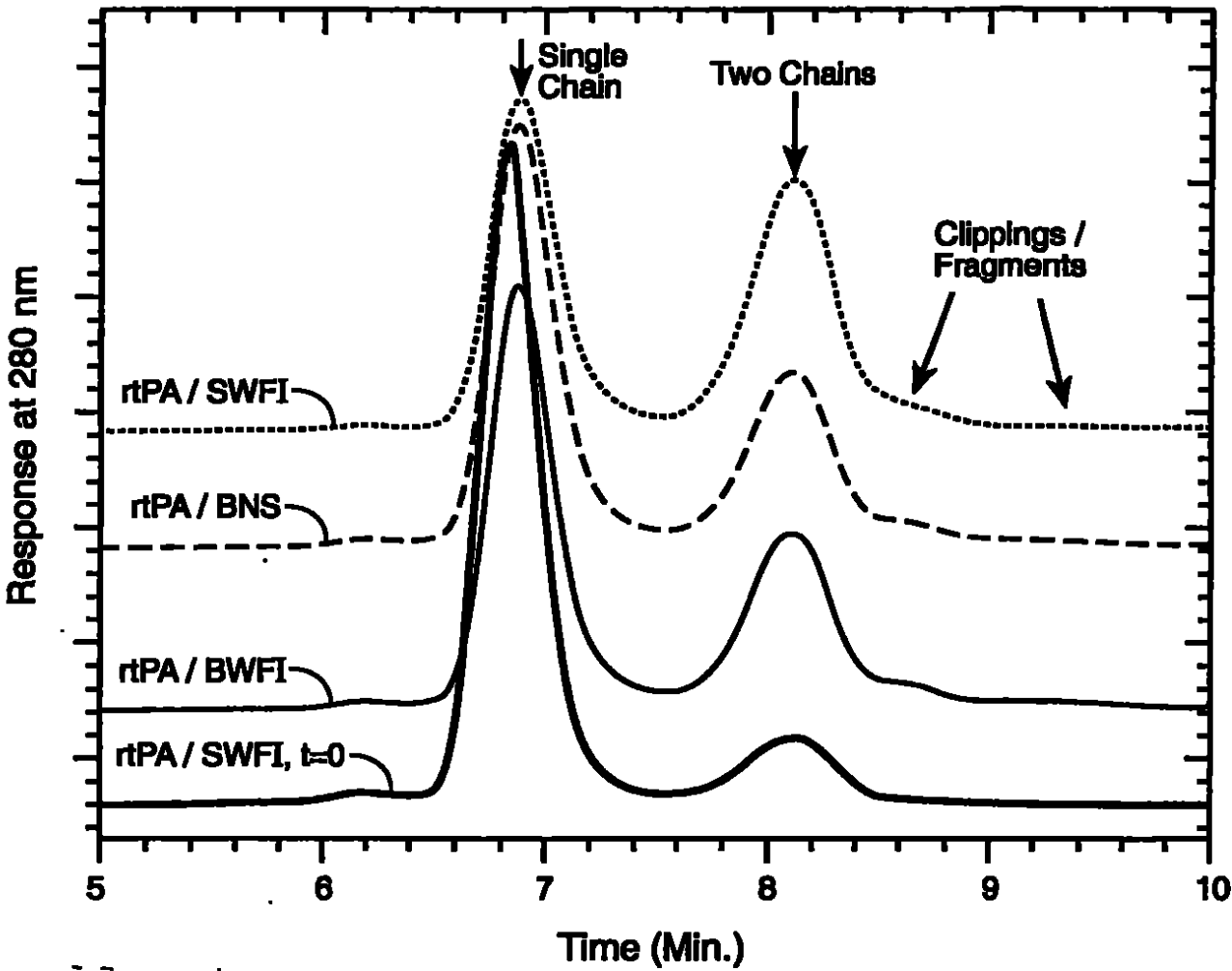


FIG. 1

36

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual

Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
6 de Junio de 2003 (05.06.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 03/045466 A3

(51)	Clasificación Internacional de Patentes: A61K 38/48, 38/00, 31/45, A61M 21/00, 31/00, 37/00	(81)	Estados Designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FIM GB, GD, GE, GH, GM, HR, HY, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UAM UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
(21)	Numero de Solicitud Internacional: PCT/US02/37878		
(22)	Fecha de Entrega Internacional: 25 de Noviembre de 2002 (25.11.2002)		
(25)	Lenguaje de entrega: Inglés	(84)	Estados Designados (regional): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(26)	Lenguaje de Publicación: Inglés		
(30)	Fecha de Prioridad: 60/333.368 26 de Diciembre de 2001 (26.12.2001) US		
(71)	Solicitante: GENETECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US).		
(72)	Inventor: SEMBA, Charles, P.; 1825 Byron Street, Palo Alto, CA 94301 (US)	Publicado	Con el informe de búsqueda internacional. antes de la fecha de vencimiento del límite de tiempo para corregir las reivindicaciones y a ser vuelto a publicar en el evento de recibir las correcciones.
(74)	Apoderado: HASAK, Janet, E.; Genetech, Inc., MS 49, 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 - 4990 (US).	(88)	Fecha de publicación del Informe Internacional de búsqueda: 9 de Octubre de 2003 Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, referirse a las "Notas de Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparece al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta del PCT.

(54) Título: COMPOSICION PARA CATÉTER Y USOS DE LA MISMA

(57) Resumen: Una composición útil para remover coágulos unidos con fibrina de un catéter comprende agua, una cantidad fibrinolítica eficaz de un activador del plasminógeno, y una cantidad preservativamente eficaz de un alcohol orgánico bacteriostático. La composición no comprende un agente quelante.

COMPOSICIÓN PARA CATÉTER Y USOS DE LA MISMA

37
A
M

Antecedentes de la Invención

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con el campo de dispositivos médicos permanentes, en particular catéteres, así como al campo de métodos y composiciones para lavar, asegurar, cubrir y recubrir estos dispositivos médicos. La invención también se relaciona con preparaciones farmacéuticas útiles para incrementar el flujo en el catéter y prevenir infecciones en catéteres con potencial de deposición de fibrina o con coágulos unidos con fibrina preexistentes.

Descripción de Divulgaciones Relacionadas

Los sistemas de despacho son ampliamente usados en la medicina como medios para introducir material líquido que puede incluir medicamentos, nutrición, u otros agentes activos a un lugar particular en un paciente. Tales sistemas frecuentemente involucran el uso de catéteres, los cuales, para muchas aplicaciones, son ubicados intravenosa o quirúrgicamente y suturados en su lugar para administración a largo plazo del material deseado. Sistemas típicos incluyen catéteres centrales tales como los que pueden utilizarse para nutrición parental total (TPN) utilizada en, por ejemplo, síndrome de intestino corto (por la duración de la vida), con el riesgo de sepsis o endocarditis. Tales sistemas también incluyen catéteres y sondas que son involucradas en diálisis peritoneal para aquellos con falla renal terminal, los cuales, si se infectan, puede llevar a la peritonitis con serias consecuencias.

Los catéteres intramusculares están entre los dispositivos médicos más comúnmente utilizados. Tales catéteres se colocan rutinariamente en el sistema vascular del paciente para muchos procedimientos y usualmente se dejan en su sitio por periodos

30
4

prolongados de tiempo. Un tipo de sistema de despacho utilizado por algunos años en el tratamiento de condiciones en humanos comprende un reservorio o recámara de volumen pequeño implantada subcutáneamente bajo la fascia con contacto directo por medio de un catéter al sistema cardiovascular. Tales sistemas se conocen como sistemas de puerto. Como un puerto y un catéter intravascular son rutas directas desde el ambiente exterior al torrente sanguíneo del paciente, la presencia del catéter o puerto presenta un potencial sustancial y continuo para la introducción de microorganismos al torrente sanguíneo del paciente.

Ahora se reconoce generalmente que la cateterización permanente en pacientes médicos, quirúrgicos, ginecológicos, urológicos o de otro tipo puede llevar a una infección seria del tracto urogenital. Los practicantes han desarrollado muchos protocolos relacionados con la colocación, uso, enganche y desenganche de dispositivos para el manejo de fluidos y otros procesos relacionados con catéteres. El objetivo de casi todos los procedimientos es evitar la introducción de microorganismos dentro del torrente sanguíneo del paciente.

Se han desarrollado un número de métodos para reducir el riesgo de infección que incorporan agente agentes contra infecciones a dispositivos médicos, ninguno de los cuales ha probado clínicamente ser completamente satisfactorio. Tales dispositivos deseablemente proporcionan niveles efectivos del agente contra infecciones durante la totalidad del periodo que se utiliza el dispositivo. Esta liberación sostenida puede ser problemática de lograr, ya que se puede requerir un mecanismo para dispersar el agente contra infecciones por un periodo prolongado de tiempo, y la incorporación de cantidades suficientes del agente contra la infección puede afectar adversamente las características superficiales del dispositivo. Las dificultades encontradas al proporcionar protección contra microbios se incrementan con el desarrollo de patógenos resistentes a las drogas.

El estándar actual de cuidado de catéteres vasculares incluye lavar el lumen del catéter con un anticoagulante, tal como heparina, para prevenir que la sangre dentro y

alrededor de la punta del catéter se coagule y obstruya el flujo de fluidos por el catéter. Más aun, la heparina no tiene actividad antimicrobiana, y, además, si no se controla cuidadosamente, puede llevar el proceso de anticoagulación demasiado lejos, presentando así un riesgo de hemorragia. La heparina también puede resultar en formación de anticuerpos, lo que lleva a una condición autoinmune seria de trombocitopenia inducida por la heparina (HIT), la cual reduce las plaquetas e incrementa aun más el riesgo de sangrado. Por lo tanto, las infecciones, así como la oclusión trombótica, continúan ocurriendo frecuentemente a pesar del uso profiláctico de lavados de heparina. El conocimiento de la patogénesis y la microbiología de infecciones venosas centrales relacionadas con el catéter es esencial para proporcionar una prevención efectiva de este problema.

El *Staphylococcus epidermis* y el *S. Aureus* son responsables del 75% de las infecciones venosas centrales relacionadas con el catéter (CVC). La especie *Candida* es responsable de otro 10% a 15% de tales infecciones. Se ha encontrado que el uso de antibióticos contra el *staphilicocco* para prevenir estas infecciones también reduce las infecciones bacteriales relacionadas con el CVC, pero solo a costas de la ocurrencia de mayores tasas de infecciones por hongos (*Candida*).

También se ha observado una correlación entre la trombogénesis y la infección. Esencialmente, una funda de fibrina que subsiguientemente actúa para cubrir las superficies internas y externas de un catéter abarca catéteres vasculares permanentes. Esta funda de fibrina proporciona a tales organismos como los *Staphylococci* y *Candida* una capacidad de adherencia mejorada a la superficie del catéter. Contrario a estos microbios particulares, los bacilos gram-negativos no se adhieren bien a la fibrina y la fibronectina. Una composición que detenga la formación de fibrina también sería particularmente útil en prevenir la colonización de *Staphylococci*, *Candida*, y semejantes, en ubicaciones de catéteres permanentes.

Cuando se introduce un medicamento en un paciente por un catéter, el practicante comúnmente sigue la introducción con una solución de lavado que puede incluir un anticoagulante tal como heparina. El propósito de la solución de lavado es el de mover el medicamento fuera del catéter tal que se entregue la totalidad de la dosis, y para dejar un lleno residual en el catéter de tal forma que la sangre del paciente no se devuelve por el catéter y posiblemente forma un coagulo que pueda obstruir el orificio del catéter. Por lo tanto, cuando el catéter vuelve a ser necesitado subsiguientemente, el catéter debidamente lavado está posiblemente totalmente patente y listo para su siguiente uso.

Root y colaboradores, Antimicrob. Agentes Chemoter., 32: 1627-1631 (1988) publicaron un estudio que reportaba sobre el efecto en los catéteres del disodio de ácido etilendiamintetraacético (EDTA), un compuesto bien conocido por sus propiedades quelantes *in vivo* y ampliamente utilizado como anticoagulante *in vitro*. La Patente de los Estados Unidos No. 5.636.754 divulgó que composiciones farmacéuticas de una mezcla de minociclina y EDTA fueron útiles en mantener la patencia de un puerto de catéter. La Patente de los Estados Unidos No. 5.091.442 describe artículos tubulares, tales como condones y catéteres, los cuales se hacen efectivamente antimicrobianos por la incorporación de un agente antimicrobiano no iónico escasamente soluble, tal como triclosan. El agente antimicrobiano puede distribuirse por todo el artículo, o en un recubrimiento del mismo. La Patente de los Estados Unidos No. 5.362.754 divulgó una preparación farmacéutica que incluye minociclina y EDTA para mantenimiento de la patencia de un catéter. La patente de los estados Unidos No. 5.362.754 reportó el uso de una mezcla de minociclina y EDTA (M-EDTA) para mantener la patencia de un puerto de catéter.

Purchase y colaboradores, Nephron, 58: 119-20 (1991) divulgó el uso de quemadores de calcio, incluyendo citrato, para éste propósito. *Butovis* y colaboradores, Artif. Organs, 22: 945-7 (1998) divulgaron que el citrato y la poligelina, la cual es un sustituto del plasma hecho de huesos de vaca, fueron tan igualmente efectivos como la heparina en mantener el catéter. En una charla presentada el la 30ª reunión anual de la

41
21
X

Sociedad Americana de Nefrología, en Noviembre 2-5 de 1997 en San Antonio, Texas, Sodemann y colaboradores reportaron que el reemplazo de catéteres debido a infección se puede evitar por aplicación rutinaria de una mezcla concentrada de gentamicina/citrato.

Sin embargo, un quemador de citrato de calcio para catéteres de diálisis, designado como TRICITRASOL™, ha tenido ciertos problemas. Algunos pacientes reportaron disgnesia por un periodo corto inmediatamente después de la inyección del citrato. Recientemente la FDA reportó un caso de un paciente que murió poco después de la inyección de citrato como seguro de catéter (Stas y colaboradores, Nephrol Dial Transplant, 16: 1521-1522 (2001); la FDA emitió una advertencia sobre el anticoagulante para catéteres de diálisis tricitrasol™. El Talk Paper de la FDA T00-16, del 14 de Abril de 2000.

La Patente de los Estados Unidos No. 5.019.096 divulgó dispositivos médicos resistentes a las infecciones que comprenden una combinación de una sal de plata (tal como sulfadiazina de plata) y clorhexidina. La Patente de los Estados Unidos No. 5.772.640 reportó artículos médicos poliméricos que comprenden los agentes contra las infecciones, clorhexidina y triclosan. La Patente de los Estados Unidos No 5.362.754 divulgó la prevención de la formación de glicocalix en un catéter por recubrimiento con EDTA y/o minociclina, previniendo infecciones bacterianas y micóticas. La Patente de los Estados Unidos No. 6.258.797 divulgó combatir la infección o sepsis en un catéter y sistemas de puerto usando una solución de aseguramiento antimicrobiana de taurolidina o taurultam.

La Patente de los Estado Unidos No. 6.166.007 divulgó seguros antimicrobianos que comprenden derivados de la taurinamida y ácidos carboxílicos y/o sales de los mismos para prevenir la infección y la coagulación de la sangre en o cerca de dispositivos médicos prostéticos después que los dispositivos han sido insertados en el paciente. La EP 1.040.841 describe la prevención de formación de trombosis y/o crecimiento bacterial en una superficie en contacto con líquido de un sistema de entrega por contacto de la

42
M
X

superficie con un líquido que previene la trombosis que tiene el agente anticoagulante, taurolidina, y/o taurultam. EP 882.461 divulga un dispositivo médico que tiene tanto actividad fisiológica como antimicrobiana que comprende un material base, una película entrecruzadas de recubrimiento formada en una superficie del material base, y cada uno de una sustancia fisiológicamente activa y una sustancia antimicrobiana unida a la película de recubrimiento.

Boorgu y colaboradores, ASAIO J., 46 (6): 767-770 (Nov. 2000) publicaron sobre una terapia de seguro adjuntivo antibiótico/anticoagulante en el tratamiento de bacterias asociadas con el uso de un dispositivo de acceso de hemodiálisis implantado subcutáneamente. Unidos al dispositivo había dos catéteres que se implanta en la vena cava superior de atrio derecho. Una terapia de seguro antibiótico/anticoagulante supone la instalación de tanto un antibiótico como un anticoagulante en el dispositivo. Ver también *Schwartz* y colaboradores, Journal of Clinical Oncology, 8(9): 1591-1597 (1990) y *Kamal* y colaboradores, JAMA, 256 (18): 2364-2368 (1991).

Wiernikowski y colaboradores, Am. J. Padiatr Hematol Oncol., 13(2): 137-140 (1991) divulgaron que soluciones salinas bacteriostáticas de lavado prevenían las infecciones del catéter en comparación con soluciones salinas normales. *Vercaigne* y colaboradores, Pharmacotherapy, 20: 394-9 (2000) hevaluaron la heparina con antibióticos como soluciones de aseguramiento para prevenir infecciones. *Patel* y colaboradores, Thromb Hemost, 82: 1205-6 (1999) divulgaron el uso exitoso de bajas dosis de r-hirudina para la trombosis de catéter de diálisis recurrente en un paciente con trombocitopenia inducida por la heparina. *Darouiche* y colaboradores, Nutrition, 13(4) (suplemento): 26S-29S (1997) reportó que se podía lograr la prevención de la infección vascular relacionadas con el catéter utilizando agentes antimicrobianos involucrando la utilización de desinfectantes tópicos tal como clorhexidina, el uso de esposas subcutáneas impregnadas de plata (para CVC's a corto plazo), el lavado de los catéteres con una combinación de agentes antimicrobianos y antitrombóticos, y recubriendo los catéteres

43
J

con ya sea agentes antisépticos (clorhexidrina y sulfadazina de plata) o antimicrobianos (minociclina y rifampina).

Las soluciones de seguro antibacterial se han utilizado para lavar catéteres. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6.174.537 divulgó una solución de lavado de catéter. Ver también *Sodermann y colaboradores*, Blood Purif., **19**: 251-254 (2001) sobre DIALOCK™ Y CSL; La solución de lavado de seguro de heparina TUBEX™ (Wyeth-Ayerst); y *Henrickson y colaboradores*, J. Clin Oncol., **18**: 1269-1278 (2000) sobre prevención de enfermedades relacionadas con CVC y eventos trombóticos usando soluciones de lavado de vancomicina/cirpofloxacin/heparina.

CVC's de esponja blanda de implante, tal como el CVC QUINTON PERMCATH™ (Quinton Instrument Co., Seattle, WA) se utilizan cada vez más en pacientes con enfermedades renales en etapa final como medio de acceso permanente. Sus principales limitaciones, aparte de la infección, son la trombosis y el flujo inadecuado de sangre. Para prevenir esas complicaciones, convencionalmente se utiliza la heparina para recubrir el CVC QUINTON PERMCATH™ entre sesiones de diálisis. *Schenk y colaboradores*, AMER. J. Kidney. Diseases, **35**: 130-136 (Enero 2000) mostró que el activador de plasminógeno de tejido recombinante (rt-PA) era superior a la heparina para recubrir el CVC QUINTON PERMCATH™ entre sesiones de hemodiálisis. Sin embargo, *Schenk y colaboradores* utilizaron 2 mg de alteplase más SWI (agua estéril para inyección, USP), lo cual no previene el crecimiento de bacterias.

Las oclusiones de dispositivo venoso central (CVAD) o bloqueo debidos a la formación de coágulos de sangre (trombos) dentro o en la punta del catéter CVAD son un problema común que puede bloquear la administración de terapias a los pacientes. Los estimativos sugieren que el 25% de los CVAD's se ocluyen, donde la trombosis es la etiología más común (*Haire y colaboradores*, Thromb. Hemost., **72**: 543-547 (1994); *Rubin*, J. Clin. Oncol., **1**: 572-573 (1983); *Lokich y colaboradores*, J. Clin. Oncol., **3**: 710-717 (1985)). En 1994, *Haire y colaboradores*, op.cit., realizaron una prueba doble ciega,

44
✓

de exploración, aleatoria de uroquinasa contra alteplasa (t-PA) en catéteres disfuncionales en los que se comprobó radiográficamente que estaban ocluidos por trombos. Los catéteres se trataron con 2 mg de alteplasa o 10.000 U de uroquinasa a los que se les permitió permanecer en el dispositivo por 2 horas. Después de 2 tratamientos, la alteplasa devolvió la función a más catéteres que la uroquinasa (89% contra 59% ($p = 0,013$)).

En Septiembre 4 del 2001, la Administración de Drogas y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) aprobó el agente trombolítico CATHFLO™ ACTIVASE® (alteplasa) t-PA, para el reestablecimiento de la función de los CVAD's, como lo evalúa la habilidad de retirar la sangre. CATHFLO™ ACTIVASE® t-PA está disponible en un vial de 2 mg para uso en un solo paciente, es el único trombolítico disponible en el mercado para ésta indicación, y le ofrece a los profesionales médicos una opción de tratamiento viable para una complicación de CVAD que pueda obstaculizar el cuidado del paciente. Un vial de CATHFLO™ t-PA contiene 2,2 mg de alteplasa, 77 mg de L-arginina, 0,2 mg de emulsificante POLYSORBATO™ 80, y ácido fosfórico para ajustar el pH a aproximadamente 7,3.

El t-PA ha sido unido a otros materiales diferentes a los catéteres vasculares. Ver, por ejemplo, *Zhou y colaboradores, J. Control Release, 55: 281-295 (1998)*; *Graco y colaboradores, Ann. Vasc. Surg., 9: 140-145 (1995)* y *Woodhouse y colaboradores, Biomaterials, 17: 75-77 (1996)*.

La Patente de los Estados Unidos No. 5.688.516 divulgó el uso de combinaciones seleccionadas de un agente quelante, un anticoagulante, o un agente antitrombótico, con un agente antimicrobiano no glicopéptido, tal como los antibióticos de tetraciclina, para recubrir un dispositivo médico e inhibir la infección del catéter. Las combinaciones preferidas incluyen minociclina y otro agente antimicrobiano no glicopéptido junto con EDTA, EGTA, DTPA, TTH, heparina, y/o hirudina en un diluyente farmacéuticamente aceptable. Similarmente, la Patente de los Estados Unidos No. 6.187.768 divulgó el uso de

45
Xb

un agente antimicrobiano y un anticoagulante, un agente antitrombótico, o un agente quelante para mantener la patencia de dispositivos médicos permanentes tal como catéteres y para prevenir infecciones causadas por el crecimiento bacteriano en catéteres.

No obstante las contribuciones al arte arriba descritas, continúa existiendo la necesidad de un método no tóxico para remover coágulos de sangre unidos con fibrina de los catéteres, dispositivos médicos especialmente permanentes. Hay una necesidad adicional para la prevención y remoción de la fibrina de tales dispositivos, ya que ciertas bacterias tienen sitios de unión que favorecen la adhesión a la fibrina en particular.

Resumen de la Invención

La presente invención divulga soluciones únicas en su habilidad para cumplir con las necesidades de arriba, las cuales no se basan en actividades anticoagulación, antitrombóticas, o quelantes y no involucran el uso de antibióticos, para los cuales los mamíferos pueden desarrollar resistencia. La presente invención resuelve las necesidades aquí establecidas utilizando un activador de plasminógeno en conjunción con un desinfectante utilizado como preservativo, principalmente un alcohol orgánico que sirva en esta capacidad. La composición resultante no solo tiene actividad fibrinolítica, sino también previene el crecimiento de patógenos, especialmente en catéteres taponados, y ha pasado los estándares USP.

La invención es como se reivindica. Específicamente, en un aspecto la presente invención proporciona una composición útil para remover los coágulos unidos con fibrina de un catéter que comprende agua, una cantidad fibrinolítica eficiente de un activador de plasminógeno, y una cantidad efectiva de preservativo de un alcohol orgánico bacteriostático, en donde la composición no comprende un agente quelante.

En otro aspecto la invención proporciona un paquete multicomponente que comprende un compartimiento que comprende una cantidad fibrinolítica eficiente de un

46
7
X

activador del plasminógeno, un compartimiento que comprende agua que contiene una cantidad preservante efectiva de un alcohol orgánico bacteriostático, en donde ningún compartimiento comprende un agente quelante, e instrucciones para mezclar los contenidos de ambos compartimientos y para usar la mezcla resultante para remover coágulos de sangre unidos con fibrina de un catéter que contiene tales coágulos de sangre.

En aun otro aspecto, la invención proporciona un paquete de compartimientos múltiples que comprende un compartimiento que comprende desde alrededor de 0,1 a 10 mg/mL de una secuencia nativa de t-PA o tenecteplasa y un compartimiento que comprende agua que contiene alrededor de 0,5 a 1,2% (v/v) de bencilalcohol, isopropanol, o etanol, donde ningún compartimiento comprende un agente quelante, e instrucciones para mezclar los contenidos de ambos compartimientos y para usar la mezcla resultante para remover coágulos de sangre unidos con fibrina de un catéter que contiene tales coágulos de sangre.

La cantidad preferida de bencilalcohol, un alcohol preferido aquí, es alrededor de 0,8 – 1,1%. Este rango y el rango más amplio de alrededor de 0,5 a 1,2% son suficientes para inhibir el crecimiento de microbios pero preservan la estabilidad y la función del activador de plasminógeno. Una ventaja de estos alcoholes es que no llevan a resistencia contra los antibióticos.

En aun otra modalidad adicional, la invención proporciona un método para remover coágulos de sangre unidos con fibrina de un catéter que contiene tales coágulos de sangre que comprende poner el catéter en contacto con la composición de arriba por al menos 5 días.

En aun otra modalidad más, la invención proporciona un catéter recubierto con la composición arriba identificada.

47
A
X

Descripción Breve de los Dibujos

La figura 1 muestra cromatogramas SEC reducidos de rt-PA reconstituida (1 mg/mL con BWFI, BNS, y SWFI) después de 14 días de almacenamiento a 37°C en viales de vidrio.

Descripción Detallada de las Modalidades Preferidas

Definiciones

Como se utiliza aquí, "catéter" hace referencia a un dispositivo médico generalmente construido de polímeros plásticos tal como, por ejemplo, poliuretano, silicona, o otros tales polímeros para el propósito de entregar una terapia médica y remover sangre. Tales catéteres representan una amplia variedad de dispositivos médicos permanentes tal como un catéter urinario, un catéter vascular tal como un CVC o un catéter periférico intravenoso, un catéter arterial, un catéter traqueal, un catéter Swan-Ganz, un catéter de hemodiálisis, un catéter umbilical, un catéter percutáneo de silicona sin túnel, un catéter venoso central esposado con túnel, y un puerto venoso central subcutáneo, y semejantes.

"Catéter vascular" se utiliza aquí para describir un catéter que involucra el sistema vascular e incluye catéteres periféricos y CVC's, dispositivos esposados a largo plazo, a corto plazo, dispositivos sin esposar, y puertos implantables. Los CVC's, los cuales son lo mismo que dispositivos de acceso venoso central (CVAD's), incluyen catéteres centrales insertados periféricamente (líneas PICC), dispositivos con esposas externas, catéteres sin esposas, catéteres sin túnel y con túnel subcutáneo, catéteres de hemodiálisis (HD), y puertos.

Los catéteres preferidos aquí son los catéteres permanentes tal como el CVC, preferiblemente un CVC esposado con túnel, un catéter periférico intravenoso, un catéter

48
A

arterial, un catéter Swan-Ganz, un catéter de hemodiálisis, un catéter umbilical, un catéter percutáneo de silicona sin túnel, o un puerto subcutáneo venoso central. También se prefiere un catéter urinario o un catéter peritoneal. Adicionalmente se prefiere un catéter intravenoso, uno que esté fabricado de un poliuretano biomédico o una silicona, o un catéter vascular.

Como se usa aquí, "preparación" o "composición" se refiere a una composición, solución, formulación, o semejantes que esta mezclada con los ingredientes establecidos.

Como se utiliza aquí, los términos "contacto", "en contacto", y semejantes significan exposición a un reactivo, por cualquier medio, tal como recubrimiento, incubación, etc.

Los términos "cubrir", "recubrir", etc., como se usan aquí, se refieren a sumergir, empapar, tratar, y/o impregnar un catéter con la composición de aquí.

Como se usa aquí, "alcohol orgánico bacteriostático" significa un alcohol orgánico que es un desinfectante utilizado como preservativo, y que no se clasifica como un antibiótico o en una clase de antibiótico. Los desinfectantes, los cuales son químicos que inhiben o matan microorganismos, se definen en Basic and Clinical Pharmacology (Farmacología básica y clínica), 8ª edición (2001), Sección VII, Chemotherapeutic Drugs (Drogas Quimioterapéuticas). Capítulo 50. Agentes Antimicrobianos Misceláneos – Desinfectantes, Antisépticos, y Esterilizantes. Los preservativos son químicos utilizados para prevenir el daño microbiano de las preparaciones. Los desinfectantes se usan como preservativos para prevenir el crecimiento aumentado de bacterias y hongos en preparaciones farmacéuticas. Deben ser efectivos en prevenir el crecimiento de microorganismos que puedan contaminarlas, y deben tener suficiente solubilidad y estabilidad para permanecer activos, en cuanto a Ellenhorn's Medical Toxicology 2ª edición (1997), Sección IV. Químicos. Capítulo 57. Antisépticos y Desinfectantes. Ejemplos de tales preservativos de alcoholes orgánicos incluyen etanol, isopropanol, y

bencilalcohol, los cuales se prefieren aquí, y con el bencilalcohol siendo el más preferido. El bencilalcohol, el cual es hidrofóbico, puede romper las paredes y membranas celulares de microorganismos, desnaturalizar proteínas, y desactivar enzimas.

"Agua bacteriostática para inyección" o "BWFI" se refiere a una mezcla de agua y diferentes cantidades de bencilalcohol y agua con ningún otro ingrediente como lo define la Farmacopea de los Estados Unidos (USP).

Como se usa aquí, "agua estéril para inyección" o "SWFI" es agua estéril sola sin ningún otro ingrediente.

Como se utiliza aquí, "salina normal" o "NS" es una mezcla de agua con una cantidad apropiada (tal como 0,9% (v/v)) de cloruro de sodio, sin ningún otro ingrediente.

Como se usa aquí, "salina bacteriostática normal" o "BNS" se refiere a agua estéril con una cantidad apropiada (tal como 0,9% (w/v)) de cloruro de sodio y con una cantidad apropiada (en otras palabras, una que es un preservativo efectivo) de un alcohol orgánico bacteriostático sin ningún otro ingrediente.

Como se usa aquí, el término "activador de plasminógeno" significa un activador de plasminógeno fibrinolítico de cadena sencilla o doble, incluyendo activador de plasminógeno urinario en forma nativa o variante, activador de plasminógeno de tejido en una forma nativa como alteplasa t-PA ACTIVASE® o en una forma variante tal como r-PA (reteplasa; RETAVASE®; Centocor, Inc.) y tenecteplasa (una variante de t-PA designada T103N, N117Q, K296A, H297A, R298A, R299A, disponibles de la marca TNKASE™ de Genetech, Inc. y descrita, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No 5.612.029), así como también uroquinasa (por ejemplo, ABBOKINASE®; Abbot), la cual puede ser una molécula nativa que ocurre naturalmente o una variante de la uroquinasa que tiene la función de un fibrinolítico disolviendo coágulos en la sangre y previniendo y removiendo la fibrina. Preferiblemente, el activador de plasminógeno es un t-PA de

50
X
5

secuencia nativa, una variante fibrinolítica del t-PA, uroquinasa de secuencia nativa, o una variante fibrinolítica de la uroquinasa. Más preferiblemente, el activador de plasminógeno es un t-PA de secuencia nativa, una variante fibrinolítica del t-PA, o una secuencia nativa de la uroquinasa. Aun más preferible, el activador de plasminógeno es un t-PA de secuencia nativa o una variante fibrinolítica del t-PA. Aun más preferiblemente, la variante del t-PA es tenecteplasa o reteplasa. Más preferiblemente el activador de plasminógeno es un t-PA de secuencia nativa o tenecteplasa.

Como se usa aquí, "agente quelante" significa un agente usado para quelar, tal como ácido etilendiamintetraacético (EDTA), DMSA, deferoxamina, dimercaprol, citrato de cinc, TRICITRASOL™ (un quelador de citrato de calcio), una combinación de bismuto y citrato, penicilamina, succimero, o etidronato. Otros agentes quelantes conocidos son el ácido de etilenglico.-bis-(beta-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) y ácido dietilene triamina (DTPA) y sales de los mismos, así como el disodio de edetato de calcio, dihidrocloruro de trietilentetramina, y aquellos que quelan los cationes metálicos divalentes tal como Ca, Mg, Mn, Fe, y Zn.

Modos para Llevar a Cabo la Invención

La presente invención proporciona una composición útil para remover coágulos de sangre unidos por fibrina de un catéter que comprende agua, una cantidad efectiva fibrinolítica de un activador de plasminógeno, y una cantidad efectiva preservante de un alcohol orgánico bacteriostático. La composición no contiene un agente quelante.

Preferiblemente el agua contiene el alcohol orgánico bacteriostático para empezar. Generalmente hay cuatro tipos de diluyentes que se utilizan para diluir o reconstituir drogas: BEFI, SWFI, BNS, y NS. La presente invención incluye solo aquellos que son bacteriostáticos, en otras palabras BWFI y BNS. Preferiblemente, el agua que contiene el alcohol es agua bacteriostática para inyección o es una salina normal bacteriostática.

N

El pH de la composición debe ser apropiado para uso biológico. Típicamente, la composición o la solución de la presente invención tendrá un pH en el rango de alrededor de 3 hasta 7, preferiblemente de 3,5 a 6,5 y, más preferiblemente de alrededor de 4,5 a 6,5. La composición normalmente estará a un pH fisiológico. De ser necesario, el pH se puede ajustar con un ácido o base adicional, tal como un ácido mineral, por ejemplo, ácido hidrocórico, o, preferiblemente, uno que no cause acidosis, tal como, por ejemplo, ácido acético, málico, o láctico. También se pueden emplear otros métodos para ajustar el pH, familiares a aquellos con habilidad en el arte.

Una prueba para determinar si la cantidad de activador en la composición es efectivamente fibrinolítico se puede realizar, por ejemplo, por ensayos de lisis de coágulos *in vitro*, tal como aquellos descritos en los ejemplos aquí proporcionados.

La cantidad efectiva preservante de alcohol se puede determinar, por ejemplo, por pruebas de efectividad antimicrobiana establecidas en los ejemplos abajo. Preferiblemente la cantidad de activador de plasminógeno es de alrededor de 0,1 a 10 mg y la cantidad efectiva preservante de alcohol orgánico es preferiblemente de 0,5 a 1,2% (v/v). Más preferiblemente, la cantidad fibrinolítica efectiva de activador de plasminógeno es de alrededor de 0,3 a 5 mg/mL, aun más preferiblemente de alrededor de 0,5 a 4 mg/mL, y más preferiblemente aun de alrededor de 1 a 3 mg/mL. La cantidad más preferida de alcohol orgánico es de alrededor de 0,8 a 1,1% (v/v).

La composición de la invención preferiblemente se expone a condiciones que hacen inviable cualquier microorganismo en ella y se empaca en un recipiente sellado, tal como una jeringa, un vial cerrado con septo, o una ampolleta que es sustancialmente resistente al paso de microorganismos. Preferiblemente, el recipiente sellado contiene una alícuota de la solución de lavado que es suficiente para realizar un procedimiento de lavado del catéter. Para aplicaciones particulares se puede preferir un recipiente a granel que contiene una cantidad suficiente de solución para dispensar múltiples alícuotas para procedimientos individuales de lavado de catéter.

52
A

Un método para lavar un catéter intravenoso que incluye proporcionar una solución mezclada como establece arriba y poner el catéter en contacto con tal solución por al menos dos horas. El método incluye llenar un dispositivo para manejo de fluidos, preferiblemente una jeringa, con una alícuota de la solución suficiente para realizar un procedimiento de lavado del catéter. La cantidad preferida para el procedimiento de lavado es generalmente de uno a tres mililitros. Luego el practicante une la jeringa al catéter intravascular objetivo que requiere lavado y administra la solución dentro del catéter, completando así el procedimiento.

El método utilizado aquí puede usarse para remover coágulos de sangre preexistentes en virtualmente cualquier catéter con túnel o sin túnel. Como parte del régimen de mantenimiento o lavado del catéter, el catéter más preferiblemente debe lavarse con ésta composición, por ejemplo, una vez a la semana, una vez cada 4 días, una vez cada 2 días, una vez al día (alrededor de cada 24 horas), dos veces las día, cada cuatro horas o según sea necesario de acuerdo con las necesidades del paciente, como lo sabe el practicante con habilidad. El régimen de lavado del catéter puede simplemente constituirse una vez cada que se cambia el catéter. En un aspecto preferido del método, el catéter debe lavarse más frecuentemente a intervalos de cuatro horas con ésta composición.

Aunque el método de esta invención se aplica a introducir la composición dentro de catéteres que ya están en su sitio, aquellos con habilidad en el arte entenderán que poner en contacto o cubrir el catéter fuera del cuerpo con la composición puede prevenir la deposición de fibrina sobre tal superficie después de su implantación y reduce los sitios para el crecimiento bacterial. Por lo tanto, las superficies de los catéteres, tal como catéteres de hemodiálisis, pueden ser tratadas previamente con ésta composición. El catéter puede tratarse inicialmente con una composición y luego, después de la inserción, someterse a lavados periódicos repetidos.

453

Catéteres particularmente ejemplares que pueden prepararse y recubrirse con las composiciones de la presente invención se proporcionan en la lista de arriba. En el método de recubrimiento el activador de plasminógeno, el agua, y el alcohol están presentes en cantidades tales que su combinación, en el artículo tratado, tiene actividad fibrinolítica y preservativa efectiva. En una modalidad específica, el catéter es un catéter de poliuretano o silicona (o uno hecho de polímeros similares) que ha sido tratado con (en otras palabras, sumergido o empapado en) una solución de tratamiento como se establece arriba. La superficie del catéter de interés luego se expone a la composición por un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de una película o recubrimiento de la composición sobre la superficie expuesta del dispositivo. Como líquido, se le permitiría a la composición secarse sobre la superficie del dispositivo para que forme una película.

La cantidad de la composición aquí inyectada sería suficiente para llenarlo. Tales dispositivos, cuando son catéteres de hemodiálisis, típicamente tienen volúmenes en el rango de 0,1 a 10 mL. Tales cantidades por supuesto varían con la longitud y el diámetro del tubo del dispositivo, el cual, *inter alia*, puede ser una función del tamaño del paciente individual.

Si se están removiendo coágulos unidos por fibrina de un catéter el catéter puede ser puesto en contacto con ésta solución por al menos 5 días, preferiblemente alrededor de 6 a 15 días.

La presente invención en incluso otro aspecto proporciona un juego o paquete. En una modalidad, el juego o paquete comprende medios contenedores, tal como una jeringa con compartimientos, que comprende al menos dos medios de compartimiento separados. Un medio de compartimiento o contenedor comprende una cantidad fibrinolítica efectiva de un activador de plasminógeno tal como t-PA, y el segundo medio de contenedor o compartimiento comprende agua que contiene una cantidad preservante efectiva de un alcohol orgánico bacteriostático. Como con la composición, ningún compartimiento

1754

comprende un agente quelante. El paquete también contiene instrucciones para mezclar los contenidos de ambos compartimientos y para usar la mezcla resultante para remover coágulos unidos con fibrina de un catéter que contiene tales coágulos de sangre. El t-PA puede ser un polvo liofilizado que esta en forma de polvo seco y es luego reconstituido cuando se mezcla con el agua para proporcionar una solución apropiada para su uso. El juego puede adicionalmente incluir un recipiente que es un medio portador adaptado para recibir los contenidos de los dos compartimientos. Éste paquete puede se un juego, donde cada compartimiento es un recipiente separado tal como un vial o ampollita, o el paquete puede ser una jeringa de compartimientos múltiples.

Varias características y aspectos de la presente invención se ilustran más en los ejemplos a seguir. Mientras estos ejemplos se presentan para mostrarle a alguien con habilidad en el arte como operar dentro del alcance de la invención, no intentan de ninguna manera servir como limitantes dentro del alcance de la invención. La divulgación de todas las citas se incorpora aquí expresamente como referencia.

EJEMPLO 1 (Comparativo)

Resumen

Se realizó la prueba como se describe abajo para evaluar las propiedades antimicrobianas de 2mg/mL de ACTIVASE® t-PA cuando se reconstituye en SWFI. Esta muestra no cumplió con los requerimientos de la prueba de efectividad antimicrobiana de la USP.

Prueba de Efectividad Antimicrobiana de la USP

Esta prueba se emplea para evaluar la eficiencia de un preservativo en una formulación o para evaluar la actividad antimicrobiana intrínseca de un ingrediente activo.

1055

Se describe en USP 24, "Pruebas Microbiológicas/(51) Pruebas de Efectividad Antimicrobiana, páginas 1809-1811.

A. Materiales y Equipo Principal

1. Los organismos de prueba utilizados fueron *Escherichia coli*, ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 9027, *Staphylococcus aureus*, ATCC 6538, *Candida albicans*, ATCC 10231, y *Aspergillus Niger*, ATCC 16404.
2. Los medios, suministros y equipo principal fueron:
 - Agar de soja tripticasa (TSA)
 - Agar de dextrosa sabouraud (SDA)
 - Salina de fosfato amortiguada (PBS), estéril, pH 7,2±0,2
 - Tubos cónicos estériles de 50 mL.
 - Tampones estériles y pipetas quirúrgicas
 - Espectrofotómetro
 - Contador de colonias, Québec o equivalente
 - Incubadoras a 2 – 8°C, 22,5±2,5°C, y 32,5±2,5°C

B. Procedimiento

1. Preparación del inóculo:

Cada suspensión de organismos se preparó para lograr una concentración aproximada de 1×10^8 unidades de formación de colonias (CFU)/mL. Cada uno de los 5 tubos que contiene 10 mL de la muestra fue inoculado con 0,05 mL de su organismo de prueba correspondiente, resultando en una concentración inicial de entre 1×10^6 CFU y 1×10^8 CFU/mL de la preparación de prueba. La población inicial de organismos viables en cada preparación de prueba se calculó en base a la concentración de organismos en cada uno de los inóculos estandarizados por el método de placa de vertimiento. Este método es una técnica microbiológica común para contar el número de organismos en la muestra de prueba. La muestra de prueba se diluye con una salina estéril y se transfiere con una pipeta a un plato de Petri estéril. Luego se vierte agar fundido (el medio nutriente) al plato

NA 56

de Petri y se mezcla con la muestra y se incuba a una temperatura y tiempo estándar. Este método produce colonias que se forman por todo el agar – no solo en la superficie.

Se muestrean aproximadamente 10 mL de muestra a un tubo que se deja sin inocular para que sirva como control negativo. En T = día 7, día 14, y día 28, se determinó la población de cada organismo en las muestras inoculadas y en el control negativo por el método de la placa de vertimiento, el método validado de conteo de placas. Las condiciones de incubación para el método de placa de vertimiento se muestran en la Tabla 1.

2. Validación del Método de Placa de Vertimiento

La muestra fue diluida en serie para obtener diluciones de 10^{-1} y 10^{-2} . Se agregó una porción de 1 mL de cada dilución de muestra a cada uno de 5 placas de Petri. Para cada dilución de muestra, se agregó una alícuota de 0,1 mL que contiene aproximadamente 1×10^3 CFU/mL de cada organismo de prueba a su correspondiente placa de Petri. En paralelo, se agregó una alícuota del mismo volumen de inóculo de cada organismo a cada una de dos placas sin las diluciones de muestra para confirmación del conteo. Se agregó una porción de 15-20 mL de agar fundido mantenido a 45°C a cada placa y se giró gentilmente para mezclar los contenidos. Se dejó que las placas se solidificaran y se incubaron como lo indica la Tabla 1.

3. Preparación de la muestra

10 mL de muestra fueron vertidos dentro de cada uno de cinco viales. Cada vial fue marcado por separado con "EC", "PA", "SA", "A", y "AN", tal que un vial fue marcado para cada organismo a probar. Se vertieron 10 mL de muestra dentro del vial marcado como control negativo. Alternativamente, para los pasos de vertimiento y marcado de arriba, se vertieron 20 mL de muestra en cada vial.



4. Determinación de la carga biológica

Usando el control negativo, se determinó la carga biológica de la muestra utilizando el método de placa de vertimiento. El medio en condiciones de incubación se utilizó como lo establece la Tabla 1.

5. Inoculación de la muestra

0,5 mL de cada una de las suspensiones de los organismos fue inoculada a 1×10^8 CFU/mL en el vial de muestra correspondiente que contiene 10 mL de muestra. El volumen del inóculo de suspensión utilizado fue el 0,5% del volumen de la muestra. La mezcla fue mezclada rigurosamente en vortice. La concentración final de la preparación de prueba fue aproximadamente de $5,0 \times 10^5$ CFU/mL. Alternativamente, si se utilizó un volumen de muestra de 20 mL en cada vial, para el paso de incubación de arriba se entregaron 0,1 mL de cada una de las suspensiones de prueba.

6. Confirmación del conteo de la concentración inicial

El conteo de placa de cada inóculo estandarizado se determinó ($1,0 \times 10^8$ CFU/mL) por el método de placa de vertimiento. El medio y las condiciones de incubación utilizados se establecen en la Tabla 1. Los conteos de placa se llevaron a cabo por duplicado para obtener el conteo promedio de placa para cada inóculo estandarizado. La concentración inicial de cada organismo de prueba se calculó usando la siguiente ecuación:

donde

S = concentración promedio del organismo de la suspensión estandarizada ($1,0 \times 10^8$ CFU/mL).

I = volumen del inóculo (0,05 mL)

P = volumen de la preparación de prueba (10 mL)

7. Almacenaje de las muestras e intervalos de prueba

Los contenedores inoculados y el control negativo fueron incubados a $22,5 \pm 2,5$ °C protegidos de la luz. Cada contenedor fue muestreado en puntos de tiempo especificados en la Tabla 2. El conteo de placa de las muestras inoculadas y el control negativo se llevó

14/58

a cabo por el método de placa de vertimiento. El conteo de placa se llevo a cabo por duplicado. Las condiciones del medio y de incubación fueron usadas como se establece en la Tabla 1.

TABLA 1
Condiciones de incubación para el Método de Placa de Vertimiento

Organismo	Medio Apropriado	Temperatura de Incubación °C	Tiempo de Incubación (días)
<i>E. coli</i> ATTC 8739	TSA	32,5±2,5	3 – 5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	TSA	32,5±2,5	3 – 5
<i>S. aureus</i> ATCC 8593	TSA	32,5±2,5	3 – 5
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	SDA	32,5±2,5	3 – 5
<i>A. Níger</i> ATCC 16404	SDA	32,5±2,5	3 – 5

TABLA 2
Puntos de Tiempo de Plaquetas para Parenterales

	0 h	6 h	24 h	7 d	14 d	28 d
USP (bacterias, levaduras u mohos)	NA	NA	NA	R	R	R
EP (bacterías)	R	R	R	R	R	R
EP (levaduras y mohos)	R	NA	NA	R	R	R

NA = no aplicable

R = requerido

59

C. Criterios de Aceptación

1. Para un estudio de prueba válido, la concentración del organismo de prueba en cada preparación de prueba fue entre 1×10^5 CFU/mL y 1×10^8 CFU/mL. No hubo una carga biológica detectable en la muestra usada en el método de conteo de placa validado.
2. Para un método de conteo de placa válido, el conteo promedio de los inóculos recuperado en cada nivel de dilución debe ser mayor a o igual al 50% del conteo promedio para el control correspondiente. Si el conteo promedio de los inóculos recuperados a una dilución es menor al 50%, todos los conteos de esa dilución se consideran invalidados.

D. Interpretación**1. USP**

Para bacterias, no debe haber menos de una reducción de 1,0 Log del conteo inicial calculado a los 7 días, no debe haber una reducción menor a 3,0 Log₁₀ del conteo inicial a los 14 días, y no debe haber un incremento desde el conteo del día 14 al del día 28.

Para levaduras y mohos, no debe haber un incremento desde el conteo inicial calculado a los 7, 14 y 28 días. "Ningún incremento" se define como no más de 0,5 Log₁₀ unidades por encima del valor medido previo.

2. EP

El criterio de evaluación de actividad antimicrobiana para preparaciones parenterales se encuentra en la Tabla 3 en términos de reducción logarítmica en el número de microorganismos viables contra el valor obtenido para el inóculo.

6/60

TABLA 3

Criterios EP para Evaluación de Actividad Antimicrobiana para Parenterales

	Reducción logarítmica					
	Criterio*	6 h	24 h	7 d	14 d	28 d
Bacterias	A	2	3	-	-	NR
Bacterias	B	-	1	3	-	NI
Hongos	A	-	-	2	-	NI
Hongos	B	-	-	-	1	NI

NR = Ninguna recuperación

NI = Ningún incremento. "Ningún incremento" se define como no más de 0,3 Log₁₀ unidades más arriba del valor medido previamente.

*El criterio A expresa la eficiencia recomendada a ser lograda. En casos justificados donde no se puede lograr el criterio A, por ejemplo, por razones de riesgo incrementado de reacciones adversas, se debe satisfacer el criterio B.

Pruebas con ACTIVASE® t-PA y SWFI

A. Materiales, Equipos y Procedimientos

La muestra fueron 2 mg/mL de altaplast ACTIVASE® t-PA en un vial con SWFI que no contiene bencilalcohol.

Los organismos de prueba y todo el medio, los suministros, y el equipo principal fueron los establecidos en la prueba de arriba. El procedimiento usado fue el mismo que el descrito en la prueba arriba, y las condiciones de incubación fueron como en la Tabla 1. El criterio de aceptación y la interpretación fueron los mismos que en la prueba de arriba.

Resultados

La concentración inicial calculada de organismos de prueba fue entre 1 x 10⁵ CFU/mL y 1 x 10⁸ CFU/mL (Tabla 4).

61
2

No hubo carga biológica en la muestra detectable usando el método de placa de vertimiento (Tabla 5).

El método de conteo de placa se validó usando el método de placa de vertimiento. El inóculo recuperado promedio en la dilución 10^{-1} de la muestra fue mayor o igual al 50% del promedio del control correspondiente (Tabla 6).

Para la *P. aeruginosa* y la *S. aureus*, hubo una reducción mayor o igual a $1,3 \text{ Log}_{10}$ desde la concentración inicial calculada en el día 7, una reducción menor a $3,0 \text{ Log}_{10}$ en el día 14 y una reducción mayor o igual a $3,6 \text{ Log}_{10}$ en el día 28 (Tablas 7 y 8). Para la *E. coli*, hubo una reducción menor al $1,0 \text{ Log}_{10}$ de la concentración inicial calculada en el día 7 y una reducción menor al $3,0 \text{ Log}_{10}$ en el día 14 y el día 28 (Tablas 7 y 8).

Para la levadura y el moho, hubo una reducción mayor o igual a $0,6 \text{ Log}_{10}$ de la concentración inicial calculada el día 7, una reducción mayor o igual a $1,0 \text{ Log}_{10}$ en el día 14, y una reducción mayor o igual a $1,6 \text{ Log}_{10}$ en le día 28 (Tablas 7 y 8).

TABLA 4
Concentración Inicial Calculada de Organismos de Prueba

Organismo de Prueba	Concentración en Suspensión (CFU/mL)	Concentración Inicial Calculada (CFU/mL)
<i>P. aeruginosa</i>	$7,7 \times 10^7$	$3,9 \times 10^5$
<i>E. coli</i>	$1,2 \times 10^8$	$6,0 \times 10^5$
<i>S. aureus</i>	$3,9 \times 10^7$	$2,0 \times 10^5$
<i>C. albicans</i>	$7,2 \times 10^7$	$3,6 \times 10^5$
<i>N. niger</i>	$1,2 \times 10^8$	$6,0 \times 10^5$

TABLA 5

Carga Biológica de la Muestra por el Método de Placa de Vertimiento

Medio	CFU recuperado de la dilución 10 ⁻¹ de la muestra	Carga biológica (CFU/mL)
TSA	0	<10
SDA	0	<10

TABLA 6

Inóculo recuperado promedio por el método de placa de vertimiento

Organismo de prueba	CFU promedio inoculado	CFU promedio recuperado de la dilución 10 ⁻¹	Porcentaje promedio de recuperación (%)
<i>P. aeruginosa</i>	65	48	74
<i>E. coli</i>	93	110	118
<i>S. aureus</i>	43	55	129
<i>C. albicans</i>	84	74	88
<i>A. niger</i>	59	46	79

TABLA 7

Población de microbios durante 28 días

Organismo de prueba	Conteo inicial calculado (CFU/mL)	7 días (CFU/mL)	14 días (CFU/mL)	28 días /CFU/mL)
<i>P. aeruginosa</i>	3,9 x 10 ⁵	6,3 x 10 ³	1,1 x 10 ⁴	50
<i>E. coli</i>	6,0 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁵	7,2 x 10 ⁵
<i>S. aureus</i>	2,0 x 10 ⁵	9,1 x 10 ³	7,4 x 10 ²	55
<i>C. albicans</i>	3,8 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>A. niger</i>	6,0 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁵	5,8 x 10 ⁴	1,4x 10 ⁴
Control negativo	<10	< 10	<10	<10

Handwritten signature and initials.

TABLA 8
Reducción logarítmica de la población microbiana durante 28 días

Organismos de Prueba	Reducción logarítmica		
	7 días	14 días	28 días
<i>P. aeruginosa</i>	1,8	1,5	3,9
<i>E. coli</i>	0,7	-0,3	-0,1
<i>S. aureus</i>	1,3	2,4	3,6
<i>C. albicans</i>	>3,6	>4,6	>4,6
<i>A. niger</i>	0,6	1,0	1,6

Discusión

En la prueba bacterial de efectividad antimicrobiana, esta muestra no cumple con los requisitos de la USP. Hubo una reducción menor a 1,0 Log₁₀ de la concentración inicial calculada en el día 7 para *E. coli*. En el día 14, la reducción logarítmica de todos los tres organismos bacteriales de prueba fue inferior a 3,0 Log₁₀. Para la levadura y el moho, no hubo un incremento del conteo inicial calculado los días 7, 14, y 28.

EJEMPLO 2

Resumen

Las pruebas se realizaron como se divulga arriba para la efectividad antimicrobiana para evaluar la eficacia de 0,8% de bencilalcohol como preservativo en 2 mg/mL de ACTIVASE® t-PA contra los requerimientos de la USP. Esta muestra cumple los requerimientos de la prueba de efectividad antimicrobiana de la USP.

Materiales, Equipo, y Procedimiento

La muestra fue ACTIVASE® t-PA (2 mg/mL) en un vial con 0,8% de bencilalcohol. Específicamente, el diluyente fue agua estéril más la cantidad apropiada de bencilalcohol para una concentración final de 0,8%.

6/6/4

Los organismos de prueba fueron aquellos descritos en el Ejemplo 1.

El medio, los suministros, y el equipo principal fue el mismo que se anotó en el ejemplo 1.

El procedimiento utilizado fue el mismo que el descrito en el ejemplo 1 y las condiciones de incubación fueron como en la Tabla 1. El criterio de aceptación fue el mismo que en el ejemplo 1.

Resultados

Los resultados fueron los mismos obtenidos en la Tabla 4 y en la Tabla 5 para la concentración inicial calculada de los organismos de prueba en cada preparación de prueba (entre 1×10^5 y 1×10^8 CFU/mL) y para la carga biológica en la muestra utilizando el método de prueba de placa de vertimiento (no se detectó carga biológica). El método de conteo de placa fue validado utilizando el método de placa de vertimiento. El inóculo promedio recuperado a la dilución 10^{-1} de la muestra fue mayor que o igual a 50% del promedio del control correspondiente (Tabla 9). Para bacterias, hubo una reducción $>3,3 \text{ Log}_{10}$ de la concentración calculada inicialmente el día 7, y una reducción $>4,3 \text{ Log}_{10}$ el día 14 y el día 28 (Tablas 10 y 11). Para levadura y moho, hubo una reducción mayor que o igual a $3,1 \text{ Log}_{10}$ desde la concentración calculada inicialmente el día 7, y una reducción mayor a $4,6 \text{ Log}_{10}$ en el día 14 y el día 28 (Tablas 10 y 11).

TABLA 9

Inóculo Recuperado Promedio por el Método de la Placa de Vertimiento

Organismo de prueba	CFU inoculado promedio	CFU recuperado promedio de la dilución 10-1	Porcentaje promedio de recuperación
<i>P. aeruginosa</i>	85	60	92
<i>E. coli</i>	93	99	106
<i>S. aureus</i>	43	55	129
<i>C. albicans</i>	84	82	97
<i>A. niger</i>	59	50	85

TABLA 10

Población Microbiana Durante 28 Días

Organismos de prueba	Conteo Inicial Calculado (CFU/mL)	7 días (CFU/mL)	14 días (CFU/mL)	28 días (CFU/mL)
<i>P. aeruginosa</i>	3,9 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>E. coli</i>	6,0 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>S. aureus</i>	2,0 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>C. albicans</i>	3,6 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>A. niger</i>	6,0 x 10 ⁵	500	<10	<10
Control negativo	<10	<10	<10	<10

TABLA 11

Reducción Logarítmica de la Población Microbiana durante 28 días

Organismos de prueba	Reducción Logarítmica		
	7 días	14 días	28 días
<i>P. aeruginosa</i>	>3,6	>4,6	>4,6
<i>E. coli</i>	>3,8	>4,8	>4,8
<i>S. aureus</i>	>3,3	>4,3	>4,3
<i>C. albicans</i>	>3,6	>4,6	>4,6
<i>A. niger</i>	3,1	>4,8	>4,8

Conclusión

Esta muestra cumple con los requerimientos de la prueba de efectividad antimicrobiana de la USP.

EJEMPLO 3

Resumen

Las pruebas se realizaron como se divulga arriba para la efectividad antimicrobiana para evaluar la eficacia de 0,9% de bencilalcohol como preservativo en 2 mg/mL de ACTIVASE® t-PA contra los requerimientos de la USP. Esta muestra cumple los requerimientos de la prueba de efectividad antimicrobiana de la USP.

Materiales, Equipo, y Procedimiento

La muestra fue ACTIVASE® t-PA (2 mg/mL) en un vial con 0,9% de bencilalcohol. Específicamente, el diluyente fue agua estéril más la cantidad apropiada de bencilalcohol para una concentración final de 0,9%.

Los organismos de prueba fueron aquellos descritos en el Ejemplo 1.

67
76

El medio, los suministros, y el equipo principal fue el mismo que se anotó en el ejemplo 1.

El procedimiento utilizado fue el mismo que el descrito en el ejemplo 1 y las condiciones de incubación fueron como en la Tabla 1. El criterio de aceptación fue el mismo que en el ejemplo 1.

Resultados

Los resultados fueron los mismos obtenidos en la Tabla 4 y en la Tabla 5 para la concentración inicial calculada de los organismos de prueba en cada preparación de prueba (entre 1×10^5 y 1×10^6 CFU/mL) y para la carga biológica en la muestra utilizando el método de prueba de placa de vertimiento (no se detectó carga biológica). El método de conteo de placa fue validado utilizando el método de placa de vertimiento. El inóculo promedio recuperado a la dilución 10^{-1} de la muestra fue mayor que o igual a 50% del promedio del control correspondiente (Tabla 12). Para bacterias, hubo una reducción $>3,3 \text{ Log}_{10}$ de la concentración calculada inicialmente el día 7, y una reducción $>4,3 \text{ Log}_{10}$ el día 14 y el día 28 (Tablas 13 y 14). Para levadura y moho, hubo una reducción mayor que o igual a $3,6 \text{ Log}_{10}$ desde la concentración calculada inicialmente el día 7, y una reducción mayor a $4,6 \text{ Log}_{10}$ en el día 14 y el día 28 (Tablas 13 y 14).

TABLA 12

Inóculo Recuperado Promedio por el Método de la Placa de Vertimiento

Organismo de prueba	CFU inoculado promedio	CFU recuperado promedio de la dilución 10^{-1}	Porcentaje promedio de recuperación
<i>P. aeruginosa</i>	65	58	89
<i>E. coli</i>	93	91	97
<i>S. aureus</i>	43	43	100
<i>C. albicans</i>	84	76	90
<i>A. niger</i>	59	38	65

63
64

TABLA 13
Población Microbiana Durante 28 Días

Organismos de prueba	Conteo Inicial Calculado (CFU/mL)	7 días (CFU/mL)	14 días (CFU/mL)	28 días (CFU/mL)
<i>P. aeruginosa</i>	3,9 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>E. coli</i>	6,0 x 10 ⁴	<100	<10	<10
<i>S. aureus</i>	2,0 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>C. albicans</i>	3,6 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>A. niger</i>	6,0 x 10 ⁵	<100	<10	<10
Control negativo	<10	<10	<10	<10

TABLA 14
Reducción Logarítmica de la Población Microbiana durante 28 días

Organismos de prueba	Reducción Logarítmica		
	7 días	14 días	28 días
<i>P. aeruginosa</i>	>3,6	>4,6	>4,6
<i>E. coli</i>	>3,8	>4,8	>4,8
<i>S. aureus</i>	>3,3	>4,3	>4,3
<i>C. albicans</i>	>3,6	>4,6	>4,6
<i>A. niger</i>	>3,8	>4,8	>4,8

Conclusión

Esta muestra cumple con los requerimientos de la prueba de efectividad antimicrobiana de la USP.

En una aplicación de recubrimiento sugerida, una solución de 2,2 mg de polvo liofilizado de CATHFLO™ACTIVASE® (alteplasa) reconstituidos con 2.2 mL de 0.9% bencilalcohol en agua bacteriostática estéril para inyección (concentración de 1mg/mL) se puede colocar dentro de un catéter vascular en un volumen igual al volumen de recubrimiento del lumen del catéter. La solución puede luego ser aspirada del catéter y descartada antes de usar el catéter para propósitos médicos.

EJEMPLO 4

Resumen

Las pruebas se realizaron como se divulga arriba para la efectividad antimicrobiana para evaluar la eficacia de 1,0% de bencilalcohol como preservativo en 2 mg/mL de ACTIVASE® t-PA contra los requerimientos de la USP. Esta muestra cumple los requerimientos de la prueba de efectividad antimicrobiana de la USP.

Materiales, Equipo, y Procedimiento

La muestra fue ACTIVASE® t-PA (2 mg/mL) en un vial con 1,0% de bencilalcohol. Específicamente, el diluyente fue agua estéril más la cantidad apropiada de bencilalcohol para una concentración final de 1,0%.

Los organismos de prueba fueron aquellos descritos en el Ejemplo 1.

El medio, los suministros, y el equipo principal fue el mismo que se anotó en el ejemplo 1.

El procedimiento utilizado fue el mismo que el descrito en el ejemplo 1 y las condiciones de incubación fueron como en la Tabla 1. El criterio de aceptación fue el mismo que en el ejemplo 1.

Resultados

Los resultados fueron los mismos obtenidos en la Tabla 4 y en la Tabla 5 para la concentración inicial calculada de los organismos de prueba en cada preparación de prueba (entre 1×10^5 y 1×10^8 CFU/mL) y para la carga biológica en la muestra utilizando el método de prueba de placa de vertimiento (no se detectó carga biológica). El método de conteo de placa fue validado utilizando el método de placa de vertimiento. El inóculo promedio recuperado a la dilución 10^{-1} de la muestra fue mayor que o igual a 50% del promedio del control correspondiente (Tabla 15). Para bacterias, hubo una reducción

OK

>3,3 Log₁₀ de la concentración calculada inicialmente el día 7, y una reducción >4,3 Log₁₀ el día 14 y el día 28 (Tablas 16 y 17). Para levadura y moho, hubo una reducción mayor que o igual a 34,1 Log₁₀ desde la concentración calculada inicialmente el día 7, y una reducción mayor a 4,6 Log₁₀ en el día 14 y el día 28 (Tablas 16 y 17).

TABLA 15

Inóculo Recuperado Promedio por el Método de la Placa de Vertimiento

Organismo de prueba	CFU inoculado promedio	CFU recuperado promedio de la dilución 10-1	Porcentaje promedio de recuperación
<i>P. aeruginosa</i>	65	64	98
<i>E. coli</i>	93	94	101
<i>S. aureus</i>	43	43	101
<i>C. albicans</i>	84	79	94
<i>A. niger</i>	59	48	81

TABLA 16

Población Microbiana Durante 28 Días

Organismos de prueba	Conteo Inicial Calculado (CFU/mL)	7 días (CFU/mL)	14 días (CFU/mL)	28 días (CFU/mL)
<i>P. aeruginosa</i>	3,9 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>E. coli</i>	6,0 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>S. aureus</i>	2,0 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>C. albicans</i>	3,6 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>A. niger</i>	6,0 x 10 ⁵	50	<10	<10
Control negativo	<10	<10	<10	<10

71

TABLA 14

Reducción Logarítmica de la Población Microbiana durante 28 días

Organismos de prueba	Reducción Logarítmica		
	7 días	14 días	28 días
<i>P. aeruginosa</i>	>3,6	>4,6	>4,6
<i>E. coli</i>	>3,8	>4,8	>4,8
<i>S. aureus</i>	>3,3	>4,3	>4,3
<i>C. albicans</i>	>3,6	>4,6	>4,6
<i>A. niger</i>	4,1	>4,8	>4,8

Conclusión

Esta muestra cumple con los requerimientos de la prueba de efectividad antimicrobiana de la USP.

EJEMPLO 5

Resumen

Las pruebas se realizaron como se divulga arriba para la efectividad antimicrobiana para evaluar la eficacia de 1,1% de bencilalcohol como preservativo en 2 mg/mL de ACTIVASE® t-PA contra los requerimientos de la USP. Esta muestra cumple los requerimientos de la prueba de efectividad antimicrobiana de la USP.

Materiales, Equipo, y Procedimiento

La muestra fue ACTIVASE® t-PA (2 mg/mL) en un vial con 1,1% de bencilalcohol. Específicamente, el diluyente fue agua estéril más la cantidad apropiada de bencilalcohol para una concentración final de 1,1%.

Los organismos de prueba fueron aquellos descritos en el Ejemplo 1.

El medio, los suministros, y el equipo principal fue el mismo que se anotó en el ejemplo 1.

El procedimiento utilizado fue el mismo que el descrito en el ejemplo 1 y las condiciones de incubación fueron como en la Tabla 1. El criterio de aceptación fue el mismo que en el ejemplo 1.

Resultados

Los resultados fueron los mismos obtenidos en la Tabla 4 y en la Tabla 5 para la concentración inicial calculada de los organismos de prueba en cada preparación de prueba (entre 1×10^5 y 1×10^8 CFU/mL) y para la carga biológica en la muestra utilizando el método de prueba de placa de vertimiento (no se detectó carga biológica). El método de conteo de placa fue validado utilizando el método de placa de vertimiento. El inóculo promedio recuperado a la dilución 10^{-1} de la muestra fue mayor que o igual a 50% del promedio del control correspondiente (Tabla 18). Para bacterias, hubo una reducción $>3,3 \text{ Log}_{10}$ de la concentración calculada inicialmente el día 7, y una reducción $>4,3 \text{ Log}_{10}$ el día 14 y el día 28 (Tablas 19 y 20). Para levadura y moho, hubo una reducción mayor que o igual a $3,6 \text{ Log}_{10}$ desde la concentración calculada inicialmente el día 7, y una reducción mayor a $4,6 \text{ Log}_{10}$ en el día 14 y el día 28 (Tablas 19 y 20).

TABLA 18

Inóculo Recuperado Promedio por el Método de la Placa de Vertimiento

Organismo de prueba	CFU inoculado promedio	CFU recuperado promedio de la dilución 10^{-1}	Porcentaje promedio de recuperación
<i>P. aeruginosa</i>	65	61	94
<i>E. coli</i>	93	118	127
<i>S. aureus</i>	43	54	127
<i>C. albicans</i>	84	77	91
<i>A. niger</i>	59	47	79

73

TABLA 19
Población Microbiana Durante 28 Días

Organismos de prueba	Conteo Inicial Calculado (CFU/mL)	7 días (CFU/mL)	14 días (CFU/mL)	28 días (CFU/mL)
<i>P. aeruginosa</i>	3,9 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>E. coli</i>	6,0 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>S. aureus</i>	2,0 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>C. albicans</i>	3,6 x 10 ⁵	<100	<10	<10
<i>A. niger</i>	6,0 x 10 ⁵	<100	<10	<10
Control negativo	<10	<10	<10	<10

TABLA 20
Reducción Logarítmica de la Población Microbiana durante 28 días

Organismos de prueba	Reducción Logarítmica		
	7 días	14 días	28 días
<i>P. aeruginosa</i>	>3,6	>4,6	>4,6
<i>E. coli</i>	>3,8	>4,8	>4,8
<i>S. aureus</i>	>3,3	>4,3	>4,3
<i>C. albicans</i>	>3,6	>4,6	>4,6
<i>A. niger</i>	>3,8	>4,8	>4,8

Conclusión

Esta muestra cumple con los requerimientos de la prueba de efectividad antimicrobiana de la USP.

EJEMPLO 6

Resumen

La alteplasa (2 mg/vial rt-PA) fue reconstituida a 1 mg/mL con BWFI, BNS, y SWFI. La estabilidad de la propina después de la reconstitución en los viales de vidrio se

L. 24

monitoreó a 37°C por 2 semanas. Después de 14 días de almacenamiento a 37°C, todas las soluciones reconstituidas parecían claras e incoloras. Las concentraciones de proteína ($1,1 \pm 0,02$ mg/mL) y el pH ($7,2 \pm 0,03$) permanecieron inalterados. El porcentaje de monómero por SEC nativo mostró una disminución gradual por 1-3% y 4-5% después de uno a dos semanas a 37°C. Una disminución en el porcentaje de cadena simple y la actividad de lisis de los coágulos (*in vitro*) se observó tras una semana a 37°C. Sin embargo, el porcentaje de cadena sencilla y actividad de lisis de coágulos (*in vitro*) se redujo drásticamente después de 14 días a 37°C. Se observaron más cortes proteolíticos para la solución de proteína reconstituida con SWFI que con BWFI o BNS. Por lo tanto, la alteplasa (2 mg/vial rt-PA) reconstituida con BWFI, BNS o SWFI a 1 mg/mL fue relativamente estable a 37°C por una semana.

Materiales y Métodos

A. Materiales

- Alteplasa (2 mg/vial rt-PA).
- BWFI, USP, 20 mL (Abbot).
- Inyección de cloruro de sodio bacteriostático al 0,9% (w/v) (BNS), USP, 20 mL (Abbot).
- SWFI, USP, 20 mL (Abbot)

B. Métodos

La alteplasa (2 mg/vial rt-PA) se reconstituye a 1 mg/mL con BWFI, BNS o SWFI (en duplicado). Las soluciones de proteína reconstituida se almacenaron a 37°C. La estabilidad de las soluciones de proteína. Se evaluó la estabilidad de las soluciones de proteína reconstituidas después de almacenaje por 3 horas, 7 días, 14 días a 37°C por los ensayos enumerados a continuación.

Para conteo de partículas por HIAC/ROYCO, se realizó un experimento separado. La alteplasa (2 mg rt-PA) se reconstituyó con BWFI, BNS, o SWFI (por duplicado) a 1mg/mL. Cuatro viales por grupo por cada punto de tiempo se combinaron juntos en un

No 15

solo vial (vial de vidrio original de 5 mL). Los conteos de partículas (muestreo de 3 x 1 mL, descartando la primera corrida) se tomaron a T = 0, 3 horas, 7 días, y 14 días después de almacenamiento a 37°C.

C. Ensayos

(1) Color y claridad. Se examinó cada muestra en un vial de vidrio bajo una caja de luz equipada con un fondo blanco y negro. El color y la claridad de la muestra se registraron en concordancia.

(2) HIAC/ROYCO. Cuatro viales de la solución de proteína reconstituida fueron combinados para la medición. El procedimiento para análisis de material particulado para parenterales de volumen pequeño se empleó con la modificación que se probó un volumen de muestra de 1 mL utilizando una jeringa de 1 mL en lugar de un volumen de 5 mL usando una jeringa de 10 mL. Se registraron los conteos de partículas en el rango de tamaño ≥ 10 y $\geq 25 \mu\text{m}$.

(3) pH. El pH de alícuotas seleccionadas se determinó usando un medidor de pH RADIOMETER PHM 93™ equipado con un electrodo de pH de combinación (Microelectrodes, Inc.). El medidor de pH se estandarizó con soluciones anfóteras de pH 4,01 y 7,00 (Mallinckrodt, Inc.). Se transfirieron 20 μL de alícuotas a un tubo Eppendorf de 0,5 mL para medición.

(4) Concentración por UV. La concentración de proteína se determinó por absorción UV a 280 nm. Se empleó un espectrofotómetro de arreglo de diodos UV/VIS (HP8253A) con una cubeta de cuarzo de 1 cm de longitud de recorrido para medición. Las muestras se diluyeron de 10 a 2,5 veces con anfótero de formulación. El blanco de la medición fue la referencia apropiada y se tomó un barrido UV de 240 a 400 nm. La concentración de proteína se calculó de la siguiente manera:

Concentración, mg/mL = $(A_{280} - A_{320})/1,9$, donde 1,9 es la absorción (mL/mg-cm) de rt-PA a 280 nm.

76

(5) % de monómero por SEC nativo. Se empleó una columna TSK 3000SWXL™ (ToSoHaas, 300 x 7,5 mm d.i., 5 µm) en una columna de cromatografía líquida (LC) HP1090™ equipada con un detector de arreglo de diodos. La fase móvil fue arginina 0,2 M, sulfato de amonio 0,12 M, isopropanol al 10%, pH 7,3. La tasa de flujo fue de 1 mL/min. Las muestras (50 µg de rt-PA equivalente) se inyectaron en singular y los cromatogramas se recolectaron a 180 nm. El porcentaje de monómero se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ monómero} = (\text{área del pico de monómero} / \text{área total del pico atribuido a la proteína}) \times 100$$

(6) % de cadena sencilla por SEC reducida. Se empleó una columna TSK 3000SWXL™ (ToSoHaas, 300 x 7,5 mm d.i., 5 µm) en un HP1090™ LC equipado con un detector de conjunto de diodos. La fase móvil fue fosfato de sodio 0,2 M, SDS al 0,1%, pH 6,8. La tasa de flujo fue de 1 mL/min. Las muestras (12,5 µg de rt-PA equivalente) se incubaron con DTT 20 mM (concentración final) a 37°C por 3 – 5 minutos e inyectadas en singulares. Los cromatogramas se monitorearon con detección a 214 nm. El porcentaje de cadena sencilla (SC) se calcula de la siguiente manera:

$$\%SC = (\text{área del primer pico principal} / \text{la suma de las áreas del primer y segundo picos principales}) \times 100$$

(7) Actividad de lisis de coágulo purificado para rt-PA. La potencia de la proteína se evaluó por el ensayo de lisis de coágulo purificado descrito en el ejemplo 7 debajo. Las muestras se diluyeron al rango de ensayo (200 – 1000 ng/mL) en dos concentraciones con diluyente. Las diluciones se realizaron el día anterior al ensayo y las muestras diluidas se almacenaron a 2 – 8°C hasta el análisis el día siguiente. Se diluyó material de referencia de rt-PA de manera similar como referencia interna.

Resultados

Los resultados del estudio se muestran en las tablas 21 y 22. Después de 14 días de almacenamiento a 37°C, todas las soluciones reconstituidas parecieron igual de claras

72 77

e incoloras. Las concentraciones de proteína ($1,1 \pm 0,02$ mg/mL) y pH ($7,2 \pm 0,03$) permanecieron inalterados. La Tabla 21 muestra el conteo de partículas por HIAC/ROYCO de la alteplasa reconstituida (2 mg/vial rt-PA, $n = 1$) a 1 mg/mL con BWFI, BNS, y SWFI después de almacenamiento a 37°C. La tabla indica un incremento en el conteo de partículas (≥ 10 y $25 \mu\text{m}$) para todas las soluciones de proteínas después de la reconstitución comparadas con el diluyente solo. Sin embargo, todos los resultados estaban bien dentro de los límites de la USP para Inyección de Volumen Pequeño (SVI, ver Tabla 23). Pareció haber una disminución en el conteo de partículas para el producto de droga reconstituida almacenado durante tiempo a 37°C. Los resultados del conteo de partículas también mostraron un número inferior de conteos para soluciones de proteínas reconstituidas con BWFI y BNS que para las reconstituidas con SWFI.

Todas la soluciones reconstituidas tenían 94 – 95% de monómero restante después de 14 días a 37°C (Tabla 22). Tanto la prueba de % de cadena sencilla como la de actividad de lisis de coágulo (*in vitro*) mostraron una disminución después de una semana a 37°C. El % de cadena sencilla es mayor para las soluciones de proteína reconstituida con BWFI o BNS que con SWFI. Sin limitarse a ninguna teoría, esto puede ser el resultado del preservativo inhibiendo la actividad proteolítica. Tras dos semanas a 37°C, el porcentaje de cadena sencilla para las soluciones de proteína reconstituida con SWFI cayó a igual o menos del 50%, lo cual está por debajo de la especificación de estabilidad ($\geq 55\%$) para la cadena sencilla de rt-PA.

Adicionalmente a la conversión de una cadena en dos cadenas, los cromatogramas los cromatogramas de reducción SEC de las soluciones de proteína reconstituida tras dos semanas a 37°C revelaron recortes/fragmentos de la molécula, lo que sugiere rompimiento proteolítico a temperatura elevada en el tiempo (ver Figura 1). La Figura 1 claramente muestra que además de los recortes o fragmentos, se observó más conversión de rt-PA de una cadena a dos cadenas en el rt-PA reconstituido con SWFI que con BWFI o BNS después de almacenamiento a 37°C por 14 días.

7/7/73

La actividad de lisis de coágulos (*in vitro*) indicó que todas las soluciones de alteplasa reconstituida (1 mg/mL) retenían una potencia mayor o igual al 100% después de tres horas a 37°C (Tabla 23). Todas las muestras eran claras e incoloras. La actividad comenzó a caer después de una semana de almacenamiento a 37°C, pero aun quedaba alrededor del 90% de la actividad (relativa a la inicial, T = 0). Hubo una reducción drástica en la actividad después de 2 semanas a 37°C, solo con 44 – 65% de actividad restante.

TABLA 21

Conteo de partículas por HIAC7ROYCO de alteplasa reconstituida (1 mg/mL, 2 mg/vial rt-PA) almacenada a 37°C por 3 horas, 7 días y 14 días

	HIAC/ROYCO			
	> 10 µm/mL	> 10 µm/vial	> 25 µm/mL	> 25 µm/vial
T = 0: BWFI rt-PA/BWFI	89 725,5	198 1596	5,5 7	12 15
T = 0 : BWFI rt-PA/BNS	50 474,5	110 1044	7 8,5	15 19
T = 3 h, 37°C BWFI rt-PA/BWFI	1 474	2 948	0 3,5	0 8
T = 3 h, 37°C BNS rt-PA/BNS	10,5 200	23 440	0 1	0 2
T = 0 : SWFI rt-PA/SWFI	10,5 603	23 1327	0 10,5	0 23
T = 0 : BWFI rt-PA/BWFI	2,5 877,5	6 1931	0 18,5	0 41
T = 0 BNS rt-PA/BNS	2 225	4 495	0 2,5	0 6
T = 7 d, 37°C SWFI rt-PA/SWFI	13,5 302,5	30 666	0 0	0 0
T = 7 d, 37°C BWFI rt-PA/BWFI	2 132,5	4 292	0 1	0 2
T = 7 d, 37°C BNS rt-PA/BNS	2 32,5	4 72	0 0,5	0 1
T = 0 : SWFI rt-PA/SWFI	6,5 769,5	14 1752	0 6	0 13
T = 0 : BWFI rt-PA/BWFI	4,5 564	10 1241	0 13,5	0 30
T = 0 : BNS tr-PA/BNS	1 587	2 1291	0 4	0 9

8079

T = 14 d, 37°C SWFI rt-PA/SWFI	4,5 491	10 1080	0 2,5	0 6
T = 14 d, 37°C BWFI rt-PA/BWFI	1,3 56,3	3 124	0 3	0 7
T = 14 d, 37°C BNS rt-PA/BNS	0,5 55	1 121	0 0	0 0

TABLA 22

Estabilidad de alteplasa reconstituida (2 mg/vial rt-PA) a 1 mg/mL con BWFI, BNS, y SWFI en viales de vidrio a 37°C

		pH	Conc. (por SEC) mg/mL	SEC nativo (% monómero)	SEC reducido (% SC)	lisis de coágulo		
						mg/mL	x 10 ³ UI/mg	% actividad relativa*
T = 0: rt-PA/BWFI	A	7,23	1,11	98,7	85,5	0,97±0,02	5,07	100
	B	7,24	1,11	98,8	85,5	1,00±0,01	5,23	100
T = 0 rt-PA/BNS	A	7,18	1,11	98,4	85,5	1,03±0,02	5,38	100
	B	7,19	1,09	98,3	85,5	0,99±0,05	5,27	100
T = 0: rt-PA/SWFI	A	7,28	1,10	98,3	85,5	1,07±0,02	5,84	100
	B	7,25	1,10	98,3	85,4	1,04±0,04	6,48	100
T = 3 h, 37°C: rt-PA/BWFI	A	7,24	1,12	98,3	85,2	1,08±0,005	5,59	110
	B	7,25	1,08	98,2	98,3	1,01±0,035	5,42	104
T = 3 h, 37°C : rt-PA/BNS	A	7,18	1,11	98,0	85,3	1,07±0,010	5,59	104
	B	7,20	1,10	97,9	85,3	1,04±0,015	5,48	104
T = 3 h, 37°C : rt-PA/SWFI	A	7,25	1,11	98,2	85,2	1,04±0,040	5,43	98
	B	7,25	1,10	98,1	85,2	1,11±0,035	5,85	107
T = 7 d, 37°C : rt-PA/BWFI	A	7,25	1,12	95,9	72,8	0,86±0,030	4,45	88
	B	7,26	1,11	96,2	73,0	0,92±0,025	4,81	92
T = 7 d, 37°C : rt-PA/BNS	A	7,20	1,10	96,9	75,1	0,91±0,045	4,80	89
	B	7,20	1,07	97,0	74,9	0,89±0,005	4,82	91
T = 7 d, 37°C : rt-PA/SWFI	A	7,28	1,11	97,5	88,7	1,00±0,03	5,23	93
	B	7,27	1,12	97,2	87,6	0,94±0,01	4,87	89
T = 14 d, 37°C : rt-PA/BWFI	A	7,28	1,10	94,5	58,0	0,56±0,02	2,95	56
	B	7,27	1,09	93,8	58,4	0,57±0,03	3,03	58
T = 14 d, 37°C : rt-PA/BNS	A	7,22	1,11	94,0	62,2	0,62±0,015	3,24	60
	B	7,22	1,10	93,9	62,1	0,62±0	3,27	62
T = 14 d, 37°C : rt-PA/SWFI	A	7,31	1,16	94,0	49,2	0,73±0	3,65	65
	B	7,29	1,16	93,9	49,0	0,48±0,01	2,40	44

* % Actividad (UI/mg) relativa a la inicial (T = 0).

8/18

TABLA 23

Límites para la materia particulada en inyecciones

Inyecciones de volumen pequeño, SVI (en base por contenedor):	>10 µm	> 25 µm
Oscurecimiento de la luz	6000	600
Microscópico	25	3

Conclusión

La alteplasa (2 mg/vial rt-PA) reconstituida con BWFI, BNS, o SWFI a 1 mg/mL fue relativamente estable a 37°C por una semana en un vial de vidrio. Se cree que la solución de BNS sería antimicrobiana, ya que es el bencilalcohol el que es el ingrediente activo. Las pruebas de estabilidad usando BNS fueron positivas, en otras palabras la alteplasa aun estaba funcional.

EJEMPLO 7

Resumen

Se encontró que la t-PA diluida hasta 0,01 mg/mL en una salina normal es líticamente activa en una prueba de efectividad de lisis de coágulos. En tal prueba, la trombina y el fibrógeno se mezclan para producir fibrina; el plasminógeno y la rt-PA se mezclan para producir plasmina; y la fibrina y la plasmina juntas lisan el coágulo. La prueba mide la efectividad de la t-PA para actuar con plasminógeno para formar plasmina y por lo tanto lisar el coágulo.

Materiales y Métodos

A. Materiales

La alteplasa (2 mg/vial rt-PA) se diluyó a una concentración de 0,01, 0,025, 0,05, y 0,1 mg/mL final de proteínas en bolsas IV que contienen NaCl al 0,9% (salina normal, NS) (Baxter y/o Abbot, 250 mL). Específicamente, la rt-PA, masa de proteína, se diluyo a 1 mg/mL (equivalente a 50 mg de formulación en vial, 0,004% de tensoactivo TWEEN 80™) con agua filtrada MILLI-Q™, o se reconstituyo rt-PA en un vial de 100 mg a 1 mg/mL

2281

(0,005 – 0,011% de tensoactivo TWEEN 80™) con agua estéril para inyección, USP (SWFI) usando una jeringa BD de 60 cc en una aguja 18G insertada directamente en el septo de caucho del vial en el centro de la torta. El vial se mezcló suavemente por acción de inversión o rodado lenta hasta que la torta estuvo totalmente disuelta. Se retiró diluyente IV (NaCl al 0,9%, NS) y se reemplazo con la misma cantidad de rt-PA reconstituida o diluida a 1 mg/mL de la siguiente manera:

Concentración Final (mg/mL)	Vol. (mL) removidos de una bolsa IV de 250 mL*
(Luego reemplazada con el mismo volumen de rt-PA a 1 mg/mL)	

0,05	12,5 (jeringa BD de 30 cc y aguja 18G)
0,024	6 (jeringa BD de 10 cc y aguja 22G)
0,01	2,5 (jeringa de 3 o 5 cc y aguja 22G)

* No se tuvo en cuenta el llenado excesivo de la bolsa.

Tras la dilución en las bolsas IV (n = 2 para cada concentración), la bolsas se mezclaron suavemente por inversión (alrededor de 20 – 24 veces). Se retiro una alícuota de 10 mL del puerto de entrada de la bolsa IV usando una jeringa BD de 10 cc y una aguja 22G. Se dispensó una alícuota (t = 0) directamente a un vial de vidrio transparente tipo I de 20 cc para inspección visual. Similamente, también se examinaron físicamente placebos equivalentes a 0,025 y 0,05 mg/mL.

B. Ensayos:

1. Inspección Visual

Cada alícuota se examinó bajo una caja de luz equipada con un fondo blanco y negro. Las alícuotas se compararon con un volumen igual de SWFI o agua MILLI-Q™ filtrada en un vial de vidrio del mismo tamaño como el que sirvió de control. El color y la claridad de las alícuotas se registraron en concordancia.

2. Ensayos de Lisís de Coágulo Purificado (Analizador Microcentrífugo (Prueba 1) y Lector de Placa (Prueba 2)):

La potencia de la proteína alteplasa t-PA se evaluó por ensayo de lisis de coágulo purificado descrita abajo. Las muestras se diluyeron al rango de ensayo (200 – 1000 ng/mL) en tres o dos concentraciones con diluyente. Las diluciones se llevaron a cabo el día anterior al ensayo y las muestras diluidas se guardaron a 2 – 8°C hasta el análisis el día siguiente. El material de referencia de la rt-PA se diluyó similarmente como referencia interna.

a. Equipo:

Se uso un analizador microcentrífugo IL MONARCH modelo No. 761™, que consiste de un ensamblaje de analizador con fluorescencia y capacidad de dispersar la luz y una computadora incorporada, y un ensamblaje de cargador.

b. Reactivos:

- Emulsificante POLYSORBATE 80™ al 1% (v/v) (JT Baker).
- Anfótero de ensayo: fosfato de sodio 0,06 M (0,0114 F $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0486 F Na_2HPO_4) con NaN_3 al 0,02% (v/v) y emulsificante POLYSORBATE 80™, pH 7,4±0,1.
- Trombina humana (30 – 40 unidades/mL) (Calbiochem) mantenida en un vial cerrado congelado a o por debajo de -60°C hasta que esta lista para su uso.
- Plasminógeno mantenido congelado a o por debajo de -60°C hasta su uso.
- Fibrinógeno Biocell preparado de la siguiente manera: el fibrinógeno y el anfótero de lisis de coágulo se llevaron a temperatura ambiente. Se adicionaron 7 mL del anfótero de lisis de coágulo al vial. Se tapó el vial y se cubrió con papel parafina. Se colocó el vial de lado entre un plato o se pegó con cinta a un agitador orbital. La velocidad se fijó entre 4 y 5. El vial se agitó hasta por una hora, mientras se revisaba para ver cuan bien se iba disolviendo la torta. Cuando la torta estuvo completamente disuelta, la solución se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL. Se enjuagó el vial al menos tres veces con anfótero de lisis de coágulo, y los enjuagues se transfirieron a un tubo Falcon para atrapar cualquier partícula o glóbulos residuales. La solución se llevó a un volumen final de 30mL usando las marcas en el tubo. El tubo se cubrió con papel parafina y se puso en el agitador por 15 – 30 minutos. Toda la proteína se solubilizó después de la agitación. La solución se puso en hielo húmedo por al menos 2 – 3 horas y se agito suavemente

83
K

periódicamente. Usando papel WHATMAN™ No. 1, la solución se filtró decantando la solución del precipitado. La solución filtrada se mantuvo en hielo.

- Material de referencia (ACTIVASE™ t-PA estándar). Todas las soluciones que contienen t-PA se mantuvieron en recipientes de poliestireno o polipropileno.

c. Preparación de los estándares:

Comenzando con el material de referencia, se preparó una solución estándar de reserva de 10 µg/mL. La dilución se registró en hojas de datos de ensayo. Los estándares restantes se prepararon de acuerdo con el siguiente esquema de dilución. Todos los estándares se mantuvieron en hielo y la expiración de la curva estándar era de 12 horas desde el momento de la preparación.

Estándar	fuentes de rt-PA	Anfótero de ensayo
200 ng/mL	200 µL de la reserva estándar	9,8 mL
400 ng/mL	400 µL de la reserva estándar	9,6 mL
600 ng/mL	600 µL de la reserva estándar	9,4 mL
800 ng/mL	800 µL de la reserva estándar	9,2 mL
1000 ng/mL	1000 µL de la reserva estándar	9,0 mL

La preparación de la solución estándar de reserva y los estándares restantes se repitieron para preparar dos curvas estándar.

d. Preparación de la Muestra:

i. Preparación inicial

Si la muestra era un vial final de material liofilizado, está se reconstituyó volumétricamente a 1 mg/mL con agua para inyección (WFI). Si la muestra era material al granel estéril, se diluyó a 1 mg/mL con WFI.

ii. Preparación de la reserva de muestra.

Utilizando una micropipeta, se transfieren con pipeta 100 µL de la muestra de rt-PA de 1,0 mg/mL a un tubo de poliestireno. Se agregó un total de 9,90 mL de anfótero de ensayo al tubo empleando una pipeta graduada de poliestireno de 10 mL o una pipeta

L584

volumétrica y una micropipeta. Esta solución se designó como la solución de reserva de muestra.

iii. Preparación de la muestra de trabajo

Utilizando una micropipeta, se transfieren con pipeta 600 μ L de la solución de reserva de muestra a un tubo de poliestireno de 15 mL. Se agregaron 9,40 mL de anfótero de ensayo al tubo usando una pipeta graduada de poliestireno de 10 mL o una pipeta volumétrica más una micropipeta. Esta era la solución de muestra a cargar en las cubetas de muestra. Las muestras diluidas se mantuvieron en hielo.

iv. Los pasos de preparación de la muestra de reserva y de preparación de la muestra de trabajo se repitieron para preparar dos diluciones de muestra.

v. Preparación del control de ensayo positivo

El control se preparó reconstituyendo una muestra de rt-PA a 1 mg/mL, transfiriendo con pipeta alícuotas de 0,5 mL a tubos Eppendorf, y congelándola a -60°C . Se descongeló un tubo nuevo cada día que se corrió el ensayo. El control se diluyó empleando 100 μ L de muestra de la misma manera que la muestra. Las muestras de control diluidas se mantuvieron en hielo.

g. Procedimiento para el Analizador MONARCH 2000™ (Ensayo 1)

El ensayo funciona de la siguiente forma: los reactivos son sustancias adicionadas a otra sustancia para participar en una reacción química. En éste caso, los contenidos del bote 1 reaccionaran con los contenidos del bote 2 para formar un coágulo estandarizado. La trombina (bote 2), cuando se mezcla con el plasminógeno y la fibrina (bote 1), causa la conversión del fibrinógeno a fibrina y forma un coágulo *in vitro* estandarizado que consiste de plasminógeno y fibrina. Luego se expone una muestra de prueba de t-PA al coágulo. La t-PA causa la conversión del plasminógeno a plasmina, y la plasmina luego se separa de las hebras de fibrina. A medida que el coágulo se separa, hay un cambio en las características de absorbancia (luz). La absorbancia se grafica contra el tiempo.

Las puntas de las pipetas del analizador se revisaron para asegurar que estaban apropiadamente alineadas, y se reviso la reserva de agua para asegurarse que

85⁴⁹ 48

estaba llena. A las jeringas se les extrajeron las burbujas de ser necesario y se llevó a cabo el ciclo de lavado.

Los parámetros del analizador fueron como se muestra en la Tabla 24.

TABLA 24
Parámetros del Analizador

Parámetros de Identificación	
Código de prueba	24
Nombre de prueba	Absorbancia general
Mnemónico de prueba	GNABS
Modo óptico	Absorbancia
Parámetros de Carga	
Tipo de carga	Cargar (Crit.), incubar, analizar
Reactivo blanco	prendido
Tipo de referencia	diluyente
Volumen de muestra	20 µL
Diluyente de muestra	0 µL
Diluyente de reactivo	0 µL
1 ^{er} reactivo	200 µL
2 ^{do} reactivo	20 µL
Código de barras del 1 ^{er} reactivo	T1
Código de barras del 2 ^{do} reactivo	T2
Parámetros de adquisición de datos	
Tipo de análisis	Mezclar
	Correr
Temperatura	37°C
Tiempo de incubación	5 minutos
Tiempo de retraso	280 segundos*

8786

Intervalo de tiempo	5 segundos
No de puntos de datos	90*
Filtro 1	340 nm
Filtro 2	340 nm
Monocromador 1	340 nm
Monocromador 2	340 nm

* Estos puntos deben ajustarse en concordancia para asegurar una adquisición completa de datos.

El bote de reactivos 1 se preparó adicionando 200 μ L de plasminógeno reconstituido a 10,0 mL de fibrinógeno filtrado. Este se mezcló suavemente y se puso en el bote de reactivo 1. El bote de reactivo 1 se colocó en la primera posición de la mesa de reactivos del analizador.

El bote de reactivo 2 se preparó agregando las 33 unidades/mL de solución de trombina descrita arriba al bote de reactivo 2. El bote de reactivo 2 se colocó en la posición 2 en el analizador.

Las cubetas de muestra de 0,25 mL se colocaron en el anillo de muestra. Utilizando pipetas de transferencia desechables o una pipeta PIPETMAN™, las cubetas de muestra se llenaron con estándar, control y muestras como lo indica la tabla 25, Esquema de Carga Sugerido. Si se estaban corriendo menos de dos muestras, la carga se hizo como se indica y el anfótero de prueba o el agua se transfirieron con pipeta dentro de cualquier cuneta vacía que estuviera interviniendo.

87
22

Tabla 25
Esquema de Carga Sugerido

ID de la Muestra	Cubeta No.	Cubeta No.
Estándar de 200 ng/mL (I)	1	3
Estándar de 400 ng/mL (I)	2	4
Estándar de 600 ng/mL (I)	3	5
Estándar de 800 ng/mL (I)	4	6
Estándar de 1000 ng/mL (I)	5	7
Control de ensayo repetición 1	6	8
Estándar de 200 ng/mL (II)	7	9
Muestra 1 dilución 1 repetición 1	8	10
Muestra 1 dilución 2 repetición 1	9	11
Muestra 2 dilución 1 repetición 1	10	12
Muestra 2 dilución 2 repetición 1	11	13
Control de ensayo repetición 2	12	14
Estándar de 400 ng/mL (II)	13	15
Muestra 1 dilución 1 repetición 2	14	16
Muestra 1 dilución 2 repetición 2	15	17
Muestra 1 dilución 1 repetición 2	16	18
Muestra 2 dilución 2 repetición 2	17	19
Control de ensayo repetición 3	18	20
Estándar de 600 ng/mL (II)	19	21
Muestra 1 dilución 1 repetición 3	20	22
Muestra 1 dilución 2 repetición 3	21	23
Muestra 1 dilución 1 repetición 3	22	24
Muestra 2 dilución 2 repetición 3	23	25
Control de ensayo repetición 4	24	26
Estándar de 800 ng/mL (II)	25	27
Muestra 1 dilución 1 repetición 4	26	28

89 83

Muestra 1 dilución 2 repetición 4	27	29
Muestra 1 dilución 1 repetición 4	28	30
Muestra 2 dilución 2 repetición 4	29	31
Control de ensayo repetición 5	30	32
Estándar de 1000 ng/mL (II)	31	33
Muestra 1 dilución 1 repetición 5	32	34
Muestra 1 dilución 2 repetición 5	33	35
Muestra 1 dilución 1 repetición 5	34	36
Muestra 2 dilución 2 repetición 5	35	37

El botón de "Solicitud Especial" se presionó en el Analizador MONARCH™. Se ingreso la información de la cubeta de muestra. Se presionó dos veces el botón de "Aceptar". Después que el analizador MONARCH™ termino de pipetear, los botes de reactivo se removieron y se colocaron en hielo. El anillo de muestra se removió y se colocó en el refrigerado a 2 – 8°C.

I. Determinación del punto final:

El punto final (tiempo de lisis) puede determinarse por un programa de computador o manualmente. Para el cálculo automático por computador, el tiempo final es el tiempo requerido para lizar el coágulo, el cual se determina automáticamente. Para determinación manual del punto final, el punto final se define como el primer punto por debajo de 0,3 unidades de absorbancia donde el cambio es inferior a 0,003 unidades de absorbancia. Específicamente, para determinación manual, el punto final se determinó de los datos de tiempo de absorbancia. Se ubicó el primer punto de absorbancia menor a 0,0300. Se determinó el punto final como el primer valor de absorbancia menor a 0,0300 si el cambio de absorbancia entre la absorbancia actual y la absorbancia subsiguiente fue menor a 0,0300. Si el delta de absorbancia fue mayor a 0,0030, se proseguía a la siguiente lectura de absorbancia y se determinaba el delta de absorbancia. El punto final fue el primer valor de absorbancia del par (valor de absorbancia inicial y subsiguiente) donde el delta de absorbancia fuera menor a 0,0030.

39
R**II. Cálculos:**

Se calculó el tiempo de lisis promedio para cada punto de la curva estándar. Las concentraciones estándar (ng/mL) y los tiempos de punto final promedio (que están en segundos) se convirtieron a valores logarítmicos. Se preparó una curva estándar del logaritmo de la concentración (eje x) contra el logaritmo del tiempo (eje y).

Usando los valores de la pendiente y el intercepto obtenidos del análisis de regresión, se calculó el logaritmo de la concentración para cada muestra del logaritmo del tiempo de lisis (punto final). Se tomó el antilogaritmo del logaritmo de la concentración obtenido y se multiplicó por el factor de dilución (por ejemplo, 1667) para obtener unidades/mL.

$$*(\text{unidades/mL}) = \text{antilogaritmo} \frac{\log \text{ tiempo de lisis} - \text{intercepto } y}{\text{pendiente}} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000000 \text{ ng}} \times (\text{dilución de la muestra}) \times (1 \text{ unidad/mg}).$$

Lo apropiado de la curva estándar se evaluó usando la prueba de aptitud del sistema. Para que una determinación sea válida bajo ésta prueba, el coeficiente de correlación para los estándares debe estar entre -0,997 y 1,000n y el control dentro de $\pm 10\%$ del valor aceptado. Si no se cumple la aptitud del sistema, se puede redefinir la curva estándar empleando el análisis de regresión lineal utilizando no menos de cuatro puntos contiguos (en otras palabras se pueden omitir el primer o último estándar)

Los resultados se reportaron como unidades/vial, unidades/mg, unidades/mL, UI/vial, UI/mg, o UI/mL, según se requiera. Para el control, se promediaron las cinco réplicas. Se avaluó la aptitud del sistema como se describe arriba. Para valores finales de vial, se promediaron las cinco réplicas por dilución de muestra. Se reportó el resultado promedio de las dos diluciones de muestras. Éste se reportó en unidades/vial, donde unidades/vial = unidades promedio/mL x mL/vial. Para muestras a granel, se promediaron las cinco réplicas por dilución de muestra. El resultado promedio de reportó de las dos diluciones de muestra. El reporte fue en unidades/mg donde:

90
16

*actividad específica (unidades/mg) = $\frac{\text{unidades de actividad mL}}{\text{mg de proteína / mL}}$

* Las unidades/mL o las unidades/mg se pueden convertir a unidades internacionales (UI)/mL o UI/mg multiplicando por el factor de conversión a unidad internacional correspondiente.

Para prueba de COA y estabilidad, se repitió la prueba de la muestra usando un rotor para cada uno de los tres días. Se reportó el promedio de los resultados para estos tres días. El ensayo puede repetirse basándose en los resultados del control interno y/o basándose en el error determinado o indeterminado. Los resultados finales se pueden reportar como un promedio de pruebas múltiples.

f. Procedimiento para el Lector de Placa (Ensayo 2):

Se prendió el lector de placas y se fijó la temperatura del termostato en 25°C. Se dejó calentar la lámpara por al menos media hora. Se agrega trombina en una cantidad de 20 µL a cada cubeta. La trombina se puede agregar desde un reservorio de reactivo o desde una placa de Interin usando una pipeta de múltiples canales. Se agregan 20 µL por cubeta de estándares diluidos (por duplicado) a las cubetas B2 – B6 y C2 – C6. Se agregaron 20 µL por cubeta de control a las cubetas D2 – G2, y se agregaron 230 µL de las muestras a las cubetas restantes por cuadruplicado en un formato vertical a un máximo de 9 muestras por placa. Las cubetas en las filas B – G que no contienen estándares, controles o muestras deben contener 20 µL de diluyente de ensayo. Las muestras de rt-PA pueden agregarse individualmente con una pipeta de un solo canal o desde una placa de Interin usando la pipeta de canales múltiples.

Mapa de pipetas sugerido

200 ng	400	600	800	1000	Dil. de	Dil. de	Dil. de	Dil. de	Dil. de
Std	ng	ng	ng	ng	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo
	Std	Std	Std	Std					
200 ng	400	600	800	1000	Dil. de	Dil. de	Dil. de	Dil. de	Dil. de

92

Std	ng Std	ng Std	ng Std	ng Std	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo
Control	Mues- tra 1	Mues- tra 2	Mues- tra 3	Mues- tra 4	Mues- tra 5	Mues- tra 6	Mues- tra 7	Mues- tra 8	Mues- tra 9

Se dejó que la solución de fibrinógeno alcanzara temperatura ambiente antes de la adición del plasminógeno. Se agregaron 200 µL de fibrinógeno-plasminógeno por cubeta a la placa tan rápidamente como fue posible a través de la placa.

Tras la adición de fibrinógeno-plasminógeno, la placa se colocó inmediatamente en el lector de paca y comenzó la recolección de datos. La primera lectura se tomó a dos minutos de la adición del fibrinógeno-plasminógeno a la placa, tal que se registró la absorbancia máxima del coágulo.

Se recolectó la absorbancia de la paca a 340 nm, y se leyó en un intervalo se tiempo apropiado (usualmente 30 segundos) hasta que se logró la absorbancia base para todas las cubetas (usualmente una hora).

i. Cálculos:

La determinación del punto final (tiempo para llegar a la mitad de la lisis máxima) se hizo de la siguiente manera: se calcularon los tiempos de lisis como el tiempo para que la absorbancia alcance la mitad de la absorbancia máxima. La absorbancia máxima correspondía a la opacidad máxima del coágulo registrada por esa cubeta. La absorbancia del fondo correspondía a la absorbancia mínima del coágulo completamente lisado. Los puntos de datos crudos (tiempos de lisis en segundos) se promediaron para cada una de las réplicas del estándar, control, y muestras. Se calculó el logaritmo del valor promediado.

Se graficó una curva estándar ingresando los datos de los tiempos de lisis (logaritmo de segundos – eje y) contra la curva estándar de concentración de proteína de rt-PA (logaritmo ng/mL – eje x).

Usando los valores de la pendiente y el intercepto obtenidos del análisis de regresión lineal, se calculó el logaritmo de la concentración para cada muestra del logaritmo de tiempo de lisis. El antilogaritmo del logaritmo de la concentración obtenido se multiplicó entonces por el factor de dilución (por ejemplo 1667) para obtener unidades/mL.

$$*(\text{unidades/mL}) = \text{antilogaritmo} \frac{\log \text{ tiempo de lisis} - \text{intercepto } y}{\text{pendiente}} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000000 \text{ ng}} \times (\text{dilución de la muestra}) \times (1 \text{ unidad/mg}).$$

Para el muestreo final de viales, las unidades se reportaron en unidades/vial, donde:

$$\text{Unidades por vial} = \text{unidades promedio/mL} \times \text{mL/vial}$$

Si se requiere una actividad específica para las muestras estériles a granel, se reportó el promedio de todas las cinco réplicas en unidades/mg, donde:

$$*\text{actividad específica (unidades/mg)} = \frac{\text{unidades de actividad mL}}{\text{mg de proteína/mL}}$$

* Las unidades/mL o las unidades/mg se pueden convertir a unidades internacionales (UI)/mL o UI/mg multiplicando por el factor de conversión a unidad internacional correspondiente.

Se determinó la aptitud del sistema. Para que una determinación fuera válida, el coeficiente de correlación para los estándares debe estar entre -0,995 y -1,000, y el control entre $\pm 10\%$ de su valor aceptado. Si no se cumple la aptitud del sistema, se puede redefinir la curva estándar corriendo el programa de cálculo nuevamente utilizando

93


menos de cuatro puntos contiguos (en otras palabras se pueden omitir el primer o el último estándar).

La actividad del rt-PA se reportó en unidades/vial, unidades/mg, unidades/mL, UI/vial, UI/mg, o UI/mL, según se requiera en la hoja de datos del ensayo. Se puede repetir el ensayo basándose en los resultados del control interno y/o basándose en el error determinado o intermedio. Los resultados finales se pueden reportar como un promedio de múltiples pruebas.

Resultados

Por inspección visual la alteplasa t-PA diluida a 0,01, 0,025, y 0,05 mg/mL con NS parecieron inicialmente como soluciones de incoloras, claras a levemente opalescentes y después de 24 horas de infusión (sin filtro) a temperatura ambiente. A 0,1 mg/mL en NS la alteplasa t-PA pareció como una solución levemente turbia inmediatamente después de la dilución y permaneció así durante todo el periodo de infusión.

En la mayoría de los casos, todas las fracciones recolectadas durante 24 horas para todas las concentraciones demostraron actividades específicas mayores al 90% como lo evalúa el ensayo de actividad de lisis de coágulos.

Conclusión

La t-PA recuperada (5 mg/mL) diluida a 0,01, 0,02 y 0,05 mg/mL en bolsas IV con NaCl al 0,9% (500 mL) era líticamente activa tras 24 horas de almacenamiento a condiciones ambiente.

EJEMPLO 8

Resumen

Se encontró que la tenecteplasa diluida a 0,01 mg/mL en salina normal era líticamente activa en una prueba de efectividad de lisis de coágulo. En tal prueba, la trombina y el fibrógeno se mezclan para producir fibrina; el plasminógeno y la

94
/K

tenecteplasa se mezclan para producir plasmina; y juntos la fibrina y la plasmina lisan el coágulo. La prueba mide la efectividad de la tenecteplasa para actuar con el plasminógeno para formar plasmina y así lisan el coágulo.

Materiales y Métodos

A. Materiales y Químicos

- Tenecteplasa, TNKASE™, vial de 50 mg.
- NaCl al 0,9% de eyección, USP, 500 mL (Baxter)
- 10 mL SWFI, USP (Abbot)
- Jeringas BD de 3 cc, 5 cc y 10 cc.
- Aguja de 22G 1,5
- Viales transparentes de vidrio Tipo I de 5 cc WHEATON™
- Tapones de líquido de butilcaucho grises de 20 mm.

B. Métodos

Tenecteplasa (TNKASE™ variante de t-PA) obtenido de Genetech, Inc. (por ejemplo Patente de los Estados Unidos No. 5.612.029) (50 mg/vial) fue reconstituida a 5 mg/mL con 10 mL de SWFI. Usando una jeringa de 3 y 5 cc y una aguja de 22G se removieron 1, 2 y 5 mL de salina normal (NS) de bolsas IV separadas (500 mL, NS, Baxter), por duplicado. El mismo volumen se reemplazó con el producto de droga reconstituido para dar una concentración final de tenecteplasa dentro de las bolsas de 0,01, 0,02 y 0,05 mg/mL. Luego las bolsas se mezclaron suavemente por inversiones. Se muestrea una alícuota de 10 mL de la solución de tenecteplasa diluida por vía del puerto IV con una jeringa de 10 cc y se dispensó en dos viales de vidrio transparente, limpios de 5 cc (6 mL en uno y el resto en el otro). Las bolsas IV que contienen la tenecteplasa diluida se colocaron en una repisa bajo luz fluorescente normal a condiciones ambiente por 24 horas. Se muestrearon alícuotas adicionales (10 mL cada una) de estas bolsas IV después de 8 y 24 horas de almacenamiento.

95
16

C. Ensayos

La determinación del pH se realizó usando un medidor de pH RADIOMETER PHM 93™ y un microelectrodo (MI-410™ Microelectrode, Inc.). El medidor de pH se estandarizó con estándares de anfótero de pH 4,01 y 7,00 antes de la medición a condiciones ambiente.

Todas las alícuotas de tenecteplasa se sometieron al ensayo de lisis de coágulos descrito arriba para determinar la actividad biológica *in vitro* de la tenecteplasa de éstas alícuotas. Las muestras se diluyeron a dos o tres concentraciones diferentes dentro del rango de ensayo (200 – 500 ng/mL) con diluyente. La tenecteplasa se uso como una referencia interna. Todos los valores obtenidos se normalizaron al material de referencia de tenecteplasa. Se ensayó la actividad biológica por lisis de coágulos antes y después de cada centrifugación.

Resultados

En la Tabla 26 se muestra un resumen de los resultados. El pH observado (7,1 – 7,2) para la concentración de tenecteplasa más alta (0,05 mg/mL en NS) fue levemente mayor al de las concentraciones más bajas (pH 6,7 – 6,8 y pH 6,8 – 6,9 a 0,01 y 0,02 mg/mL, respectivamente). Esto se debe a una que se agregó mayor cantidad de tenecteplasa con anfótero (5 mg/mL, pH 7,3) a la bolsa IV directamente para dilución inicial. Pero todos los valores de pH permanecieron inalterados tras 24 horas de almacenamiento a condiciones ambiente. La actividad de lisis de coágulos y las concentraciones de proteína (determinadas por RP-HPLC) se realizaron antes y después de la centrifugación de cada alícuota de muestra. Esto se hizo para asegurar que cualquier precipitación que no fuera visible a simple vista fuera removida antes del ensayo para una interpretación más precisa de los resultados. En todos los casos, los resultados tras la centrifugación fueron levemente inferiores tanto para la actividad como para la concentración que antes de la centrifugación, lo que sugiere que ocurrió una pequeña cantidad de precipitación. La Tabla 26 muestra el porcentaje de cambio en la concentración antes y después de la centrifugación, lo cual indica que la pérdida de

96
97
98

proteína es mayor en 0,01 y 0,02 mg/mL, inicialmente poco después de la dilución que a la concentración más alta (0,5 mg/mL). Este porcentaje de cambio a la concentración más baja (0,01 mg/mL) también se incrementó con el tiempo de almacenamiento. A 0,01 mg/mL, el porcentaje de cambio en la concentración fue del 57% inmediatamente después de la dilución y se incrementó a 71% después de 24 horas. No se observó un cambio significativo en 0,02 y 0,05 mg/mL. Esta observación se puede explicar, sin limitarse a ninguna teoría, por una absorción más pronunciada de proteína a una concentración más baja que la que usualmente ocurre instantáneamente y se satura con el tiempo.

La Tabla 27 muestra que el porcentaje de proteína recuperada relativo a las concentraciones objetivo a 0,01, 0,02 y 0,05 mg/mL fue de 40 – 50%, 65% y 86 – 92%, respectivamente. Esta recuperación actual fue subestimada debido al volumen de exceso de llenado dentro de la bolsa IV no se tuvo en cuenta y la proteína recuperada sería al menos 10% menor que las concentraciones esperadas (asumiendo 10% de exceso de llenado en la bolsa IV).

La actividad de lisis de coágulos de la proteína recuperada (después de la centrifugación) no cambió significativamente tras 24 de almacenamiento a condición ambiente. El porcentaje general de actividad específica de la proteína recuperada a 0,01, 0,02 y 0,05 mg/mL fue $\geq 100\%$, $\geq 92\%$ y $\geq 80\%$ respectivamente (Tabla 27).

TABLA 26

Resumen de la estabilidad de diluciones de Tenecteplasa en bolsas IV con NaCl al 0,9%
(500 mL)

Tiempo	Conc. Objetivo* (mg/mL)	pH	Lisis de coágulo (- cent) (mg/mL)	Lisis de coágulo (+ cent) (mg/mL)	Conc.** (-cent) (mg/mL)	Conc.** (+ cent) (mg/mL)	% cambio en conc. (+ cent)
T = 0	0,01	6,70	0,008	0,004	0,007	0,004	57
T = 0	0,01	6,73	0,008	0,004	0,007	0,004	57
T = 0	0,02	6,83	0,015	0,012	0,017	0,013	76
T = 0	0,02	6,83	0,015	0,012	0,017	0,013	76
T = 0	0,05	7,12	0,040	0,037	0,048	0,045	94
T = 0	0,05	7,15	0,041	0,036	0,047	0,046	98
T = 8 horas, ambiente	0,01	-	0,007	0,005	0,007	0,004	57
T = 8 horas, ambiente	0,01	-	0,008	0,006	0,008	0,005	63
T = 8 horas, ambiente	0,02	-	0,015	0,012	0,016	0,013	81
T = 8 horas, ambiente	0,02	-	0,013	0,012	0,016	0,013	81

97

T = 8 horas, ambiente	0,05	-	0,039	0,034	0,047	0,045	98
T = 8 horas, ambiente	0,05	-	0,039	0,037	0,047	0,045	98
T = 24 horas, ambiente	0,01	6,77	0,007	0,005	0,007	0,005	71
T = 24 horas, ambiente	0,01	6,71	0,007	0,008	0,007	0,005	71
T = 24 horas, ambiente	0,02	6,86	0,015	0,013	0,016	0,013	81
T = 24 horas, ambiente	0,02	6,90	0,016	0,012	0,016	0,013	81
T = 24 horas, ambiente	0,05	7,10	0,043	0,040	0,048	0,043	90
T = 24 horas, ambiente	0,05	7,07	0,043	0,040	0,046	0,44	98

* Concentración objetivo. El llenado excesivo de la bolsa IV no se tuvo en cuenta.

** Concentración por RP-HPLC.

- cent = antes de la centrifugación.

+ cent = después de la centrifugación.

TABLA 27

Actividad biológica, % de recuperación de proteína y % de actividad específica de la Tenecteplasa diluida tras el almacenamiento.

Tiempo	Conc. * (mg/mL)	Conc. ** (+ cent) (mg/mL)	% Recuperación de proteína (de la conc. Objetivo)	Lísis de coágulo (+cent) (mg/mL)	% Actividad específica
T = 0	0,01	0,004	40	0,004	100
T = 0	0,01	0,004	40	0,004	100
T = 0	0,02	0,013	65	0,012	92
T = 0	0,02	0,013	65	0,012	92
T = 0	0,05	0,045	90	0,037	82
T = 0	0,05	0,046	92	0,036	78
T = 8 horas, ambiente	0,01	0,004	40	0,005	125
T = 8 horas, ambiente	0,01	0,005	50	0,006	120
T = 8 horas, ambiente	0,02	0,013	65	0,012	92
T = 8 horas, ambiente	0,02	0,013	65	0,012	92
T = 8 horas, ambiente	0,05	0,045	90	0,034	78
T = 8 horas, ambiente	0,05	0,045	90	0,037	82
T = 24 horas, ambiente	0,01	0,005	50	0,005	100
T = 24 horas, ambiente	0,01	0,005	50	0,006	120
T = 24 horas, ambiente	0,02	0,013	65	0,013	100
T = 24 horas, ambiente	0,02	0,013	65	0,012	82
T = 24 horas, ambiente	0,05	0,043	86	0,040	93
T = 24 horas, ambiente	0,05	0,044	88	0,040	91

* Concentración objetivo. El llenado excesivo de la bolsa IV no se tuvo en cuenta.

** Concentración por RP-HPLC.

+cent = después de la centrifugación

% de recuperación de proteína = [Conc. (+cent), mg/mL / Conc. Objetivo, mg/mL] x 100%

% de actividad específica = [Lísis de coágulos (+cent), mg/mL / Conc. (+cent), mg/mL] x 100%

Conclusión

Como con la t-PA como se anotó arriba, la tenecteplasa (5 mg/mL) diluida a 0,01, 0,02 y 0,05 mg/mL en bolsas IV con NaCl al 0,9% (500 mL) tenía actividad lítica después de 24 horas de almacenamiento a condiciones ambiente.

Las composiciones y preparaciones arriba descritas se espera que sean efectivas en pravenir la adherencia y colonización de superficies de catéteres por organismos infecciosos tal como *S. aureus*, *S. epidermis*, y hongos.

99.
i
007**LO QUE REIVINDICA ES:**

1. Una composición útil para remover coágulos unidos por fibrina de un catéter que comprende agua, una cantidad fibrinolítica eficaz de un activador de plasminógeno, y una cantidad preservativamente eficaz de un alcohol orgánico bacteriostático, en donde la composición no comprende un agente quelante.
2. La composición de la reivindicación 1 donde el activador de plasminógeno es un activador de plasminógeno de tejido o una uroquinasa.
3. La composición de la reivindicación 2 donde el activador de plasminógeno es una t-PA de secuencia nativa, una uroquinasa de secuencia nativa, reteplasa o tecneteplasa.
4. La composición de la reivindicación 3 en donde el activador de plasminógeno es una t-PA de secuencia nativa o tenecteplasa.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4 en donde el alcohol orgánico es bencilalcohol, isopropanol o etanol.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 5 en donde el alcohol orgánico es bencilalcohol.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 6 en donde la cantidad fibrinolítica efectiva del activador de plasminógeno es de alrededor de 0,1 a 10 mg/mL y la cantidad preservativamente eficaz del alcohol orgánico es de alrededor de 0,5 a 1,2% (v/v).

801/101

8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 7 en donde la cantidad fibrinolítica eficaz del activador de plasminógeno es de alrededor de 0,3 a 4 mg/mL.
9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 8 en donde el agua que contiene al alcohol es agua bacteriostática para inyección o es una salina bacteriostática normal.
10. Un método para remover coágulos de sangre unidos con fibrina de un catéter que contiene tales coágulos de sangre que comprende poner el catéter en contacto con la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 9 por al menos 5 días.
11. El método de la reivindicación 10 en donde el catéter es puesto en contacto con la composición por alrededor de 6 a 15 días..
12. U catéter empapado con la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 9.
13. El catéter de la reivindicación 12 que es un catéter permanente.
14. Un paquete de múltiples compartimientos que comprende un compartimiento que comprende una cantidad fibrinolítica eficaz de un activador de plasminógeno, un compartimiento que comprende una cantidad preservativamente efectiva de un alcohol orgánico bacteriostático, en donde ningún compartimiento comprende un agente quelante, e instrucciones para mezclar el contenido de ambos compartimientos usando la mezcla resultante para remover coágulos de sangre unidos con fibrina de un catéter que contiene tales coágulos de sangre.
15. El paquete de la reivindicación 14 en donde el activador de plasminógeno es un activador de plasminógeno de tejido o una uroquinasa.

101
22
101

16. El paquete de la reivindicación 15 en donde el activador de plasminógeno es una t-PA de secuencia nativa, una uroquinasa de secuencia nativa, reteplasa o tenecteplasa.
17. El paquete de la reivindicación 16 en donde el activador de plasminógeno es una t-PA de secuencia nativa o una tenecteplasa.
18. El paquete de cualquiera de las reivindicaciones 14 – 17 en donde el alcohol orgánico es bencilalcohol, isopropanol, o etanol.
19. El paquete de cualquiera de las reivindicaciones 14 – 18 en donde el alcohol orgánico es bencilalcohol.
20. El paquete de cualquiera de las reivindicaciones 14 – 19 en donde la cantidad fibrinolítica eficaz de activador de plasminógeno es de alrededor de 0,1 a 10 mg/mL y la cantidad preservativamente eficaz de alcohol orgánico es de alrededor de 0,5 a 1,2% (v/v)
21. El paquete de cualquiera de las reivindicaciones 14 – 20 en donde la cantidad fibrinolítica eficaz de activador del plasminógeno es de alrededor de 0,3 a 4 mg/mL.
22. El paquete de cualquiera de las reivindicaciones 14 – 21 que es un juego, en donde cada compartimiento es un recipiente aparte o el paquete es una jeringa de múltiples compartimientos.
23. El paquete de cualquiera de las reivindicaciones 14 – 22 en donde el agua que contiene el alcohol es agua bacteriostática para inyección o es una salina bacteriostática normal.

102
201
3
0
1

24. Un paquete de compartimientos múltiples que comprende un compartimiento que comprende de alrededor de 0,1 a 10 mg/mL de una t-PA de secuencia nativa o tenecteplasa y un compartimiento que comprende agua que contiene de alrededor de 0,5 a 1,2% (v/v) de bencilalcohol, isopropanol, o etanol, en donde ningún compartimiento comprende un agente quelante, e instrucciones para mezclar los contenidos de ambos compartimientos y para resultar la mezcla resultante para remover coágulos de sangre unidos por fibrina de un catéter que contiene tales coágulos de sangre

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION) - printed on 25.11.2002 02:08:09 PM

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.06.2002)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	P1932R1
I	Title of invention	CATHETER COMPOSITION AND USES THEREOF
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States
II-4	Name	GEMENTECH, INC.
II-5	Address:	1 DNA Way SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	1-650-225-1000
II-9	Facsimile No.	1-650-952-9881
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	inventor only
III-1-4	Name (LAST, First)	SEMBA, Charles P.
III-1-5	Address:	1925 Byron Street Palo Alto, CA 94301 United States of America

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION) - printed on 20.11.2002 02:27:36 PM

P1832R1

104/5

IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	HASAK, Janet E.
IV-1-2	Address:	c/o GEMENTECH, INC. MS 49 1 DNA Way South San Francisco, CA 94080-4990 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	1-650-225-1000
IV-1-4	Facsimile No.	1-650-952-9881
V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE SK TR and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT
V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG UZ VC VN YU ZA ZM ZW

PCT REQUEST

3/4

P1932R

Original (for SUBMISSION) - printed on 20.11.2002 02:27:36 PM

V-5	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.		
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE	
VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	26 November 2001 (26.11.2001)	
VI-1-2	Number	60/333,369	
VI-1-3	Country	US	
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1	International Searching Authority Chosen	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (ISA/US)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	-
IX-2	Description	52	-
IX-3	Claims	3	-
IX-4	Abstract	1	EXABST00.TXT
IX-5	Drawings	1	-
IX-7	TOTAL	61	

PCT REQUEST

P1932R9

Original (for SUBMISSION) - printed on 20.11.2002 02:27:36 PM

	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-11	Copy of general power of attorney	✓	-
IX-17	PCT-EASY diskette	-	Diskette
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	1	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative	<i>Janet E. Hasak</i>	
X-1-1	Name (LAST, First)	HASAK, Janet E.	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/US
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
JANET E. HASAK
C/O GENENTECH, INC.
MS 49
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of Mailing
(day/month/year) **04 AUG 2003**

Applicant's or agent's file reference
P1932R1

RECEIVED

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.
PCT/US02/37878

AUG 07 2003

International filing date
(day/month/year)
25 November 2002 (25.11.2002)

Applicant
GENENTECH, INC.

**GENENTECH, INC.
LEGAL DEPT.**

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of publication of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland. Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

CALENDARED/L
US-105 Due (30 Day) for P1932R
US
6 SEP 03
DUE DATE

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the costs of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90 bis.1 and 90 bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1430
Alexandria, Virginia 22313-1430
Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Valerie Bell-Harris

Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/ISA/220 (April 2002)

(See notes on accompanying sheet)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P1932R1	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, Item 5 below.
International application No. PCT/US02/37878	International filing date (day/month/year) 25 November 2002 (25.11.2002)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 26 November 2001 (26.11.2001)
Applicant GENENTECH, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 2 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the Report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application, in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box II).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/37878

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 38/49, 38/00, 31/45; A61M 21/00, 31/00, 37/00

US CL : 514/2, 488, 489, 727; 424/94.1, 520; 604/500, 508, 523, 93.01; 530/350

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 514/2, 488, 489, 727; 424/94.1, 520; 604/500, 508, 523, 93.01; 530/350

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OURIEL, K. et al. Comparison of streptokinase, urokinase, and recombinant tissue plasminogen activator in an in vitro model of venous thrombolysis. November 1995, Vol. 22, pages 593-597. Entire document.	1-5, 12-17 and 24
Y	ANTANI, M. R. Catheter-directed thrombolysis for the treatment of acute deep venous thrombosis. Suppl. Appl. Radiol. July 2001, pages 29-35. Entire document.	1-5, 12-17 and 24
Y	US 6,124,277 A (SCHACHT, A. L. et al.) 26 September 2000, column 6, lines 22-36, and columns 35-36.	1, 5-6, 9, 12-14, 18-19 and 22-24
Y	US 6,206,914 B1 (SOYKAN, O. et al.) 27 March 2001, Abstract, columns 10-11 and column 13, lines 29-45.	1, 5-6, 9, 12-14, 18-19 and 22-24
Y, P	US 2002/0082582 A1 (FINCH, C. D. et al.) 27 June 2002, claims 1-27, abstract, and paragraphs 4-5, 7, 10, 12-16.	1, 5-7, 10-14 and 18-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 July 2003 (21.07.2003)

Date of mailing of the international search report

04 AUG 2003

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US

Commissioner for Patents

P.O. Box 1430

Alexandria, Virginia 22313-1430

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Valerie Bell-Harris

Telephone No. 703-308-0196

77/110

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty and of the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule" and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purpose of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

The claims only.

The description and the drawings may only be amended during international preliminary examination under Chapter II.

When? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 36 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.2).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How? Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 265(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confounded with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

JANET E. HASAK
C/O GENENTECH, INC.
MS 49
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA
94080-4990

RECEIVED

SEP 10 2003

GENENTECH, INC.
LEGAL DEPT.

NOTIFICATION OF RECEIPT
OF DEMAND BY COMPETENT INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

(PCT Rules 59.3(e) and 61.1(b), first sentence
and Administrative Instructions, Section 601(a))

Date of mailing
(day/month/year)

09 SEP 2003

Applicant's or agent's file reference

P1832R1

R

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US02/37878

International filing date (day/month/year)

25 Nov 2002

Priority date (day/month/year)

28 Nov 2001

Applicant

GENENTECH, INC.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority considers the following date as the date of receipt of the demand for international preliminary examination of the international application:

22 May 2003

2. That date of receipt is:

- ☒ the actual date of receipt of the demand by this Authority (Rule 61.1(b)).
☐ the actual date of receipt of the demand on behalf of this Authority (Rule 59.3(e)).
☐ the date on which this Authority has, in response to the invitation to correct defects in the demand (Form PCT/IPEA/404), received the required corrections.

3. ☐ ATTENTION: That date of receipt is AFTER the expiration of 19 months from the priority date. Consequently, the election(s) made in the demand does (do) not have the effect of postponing the entry into the national phase until 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)). Therefore, the acts for entry into the national phase must be performed within 20 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 22). For details, see the PCT Applicant's Guide, Volume II.

- ☐ (If applicable) This notification confirms the information given by telephone, facsimile transmission or in person on:

4. Only where paragraph 3 applies, a copy of this notification has been sent to the International Bureau.

Name and mailing address of the IPEA/
Mail Stop PCT, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 703-305-3230

Form PCT/IPEA/402 (July 1998)

Authorized officer

Valerie Jackson

Telephone No. 703-305-3756

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:
JANET E. HASAK
C/O GENENTECH, INC.
MS 49
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990

PCT

WRITTEN OPINION

(PCT Rule 66)

RECEIVED

NOV 12 2003

GENENTECH,
LEGAL DEPT

Date of Mailing
(day/month/year)

07 NOV 2003

Applicant's or agent's file reference

B1932R1

REPLY DUE

within 2 months/days from
the above date of mailing

International application No.

PCT/US02/37878

International filing date (day/month/year)

25 November 2002 (25.11.2002)

Priority date (day/month/year)

26 November 2001 (26.11.2001)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

IPC(7): A61K 38/49, 38/00, 31/045; A61M 21/00, 31/00, 37/00 and US Cl.: 514/2, 488, 489, 727; 424/94.1, 520; 604/500, 508, 523, 93.01; 530/350

Applicant

GENENTECH, INC.

1. This written opinion is the first (first, etc.) drawn by this International Preliminary Examining Authority.

2. This opinion contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the opinion
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Rule 66.2 (a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

3. The applicant is hereby invited to reply to this opinion.

When? See the time limit indicated above. ~~The applicant may, before the expiration of that time limit, request this Authority to grant an extension. See rule 66.2(d).~~

How? By submitting a written reply, accompanied, where appropriate, by amendments, according to Rule 66.3. For the form and the language of the amendments, see Rules 66.8 and 66.9.

Also For an additional opportunity to submit amendments, see Rule 66.4. For the examiner's obligation to consider amendments and/or arguments, see Rule 66.4 bis. For an informal communication with the examiner, see Rule 66.6

If no reply is filed, the international preliminary examination report will be established on the basis of this opinion.

4. The final date by which the international preliminary examination report must be established according to Rule 69.2 is: 26 March 2004 (26.03.2004)

Name and mailing address of the IPEA/US

Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Valerie Bell-Harrison
Samuel W. Liu

Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/IPEA/408 (cover sheet)(July 1998)

CALENDAR/CK

Response to Written Opinion

7 JAN 04

DUE DATE

WRITTEN OPINION

International application No.

PCT/US02/37878

I. Basis of the opinion

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-52, as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages 53-55, as originally filed
 pages NONE, as amended (together with any statement) under Article 19
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
 pages 1-1, as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages NONE, as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the written opinion was drawn on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in printed form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages NONE
- ☐ the claims, Nos. NONE
- ☐ the drawings, sheets/fig NONE

5. ☐ This opinion has been drawn as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this opinion as "originally filed."

114/

WRITTEN OPINION

International application No.
PCT/US02/37878

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. STATEMENT

Novelty (N)	Claims <u>1-24</u>	YES
	Claims <u>none</u>	NO
Inventive Step (IS)	Claims <u>5-8 and 14-24</u>	YES
	Claims <u>1-4 and 9-13</u>	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims <u>1-24</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

2. CITATIONS AND EXPLANATIONS

Please See Continuation Sheet

115

WRITTEN OPINION

International application No.

PCT/US02/37878

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the questions whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claims 6-9 and 19-23 are objected to under PCT Rule 66.2(a)(iii) as containing the following defect(s) in the form or contents thereof: these claims are in improper form because a multiple dependent claim should refer to other claims in the alternative only. A multiple dependent claim shall not serve as a basis for any other multiple dependent claim. Thus, claims 6-9 and 19-23 cannot depend from any other multiple dependent claims 5 and 18, respectively.

WRITTEN OPINION

International application No.
PCT/US02/37878

116
117

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

TIME LIMIT:

The time limit set for response to a Written Opinion may not be extended. 37 CFR 1.484(d). Any response received after the expiration of the time limit set in the Written Opinion will not be considered in preparing the International Preliminary Examination Report.

V. 2. Citations and Explanations:

Claims 1-4 and 9-13 lack inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Bridon D. P. et al. (US Pat. No. 6087375) taken with Ku, D. N. (US Pat. No. 6231605), Schacht, A. L. et al. (US Pat. No. 6124277), Soykan, O. et al. (US Pat. No. 6206914) and Bennett W. F. et al. (US Pat. No. 5612029).

Bridon et al. teach a composition comprising a thrombin inhibitor and alcohol thrombin formulated in a physiologically acceptable formulation which does not contain chelating agent (see column 6, line 65 to column 7, line 8), as applied to claims 1-4 and 9 of the current application.

Ku teaches a composition comprising a bioactive agent that is thrombin inhibitor and an alcohol (i.e., poly(vinyl alcohol) hydrogel) (see column 7, lines 45-55), as applied to claims 1-4 and 9 of the current application. Also, Ku teaches the composition comprising the vinyl-alcohol hydrogel is useful for a catheter coating (see column 4, lines 35-37, as applied to the application claims 12-13).

Schacht et al. teach tissue plasminogen activator is a type of thrombin inhibitor (see column 39, lines 49-51), as applied to the application claims 1-4.

Soykan et al. teach an anticoagulant composition comprising tissue plasminogen activator (t-PA) which is incorporated into a suitable carriers for use in delivery devices for removing blood clots (see column 5, lines 55-63, and the patent claim 29) e.g., indwelling catheters (see column 8, lines 51-55, and the patent claim 37), as applied to the application 12-13.

In addition, Soykan et al. teach a process of removing blood clot comprising contacting the catheter coated with the composition containing t-PA (see column 13, lines 59-64), as applied to the application claim 10. Yet, Soykan et al. does not explicitly teach the limitation regarding the period of time for the contacting the catheter thereof. Bennett et al. teach that the therapeutically effective amount of the t-PA is continuously release at the site for a period of time of about from 3 days to two weeks which meets the limitation set forth in the application claims 10-11.

It would have been obvious to skilled artisan at the time the invention was made to have combined the teachings of the above references because (i) Ku and Bridon et al. both teach composition comprising a thrombin inhibitor and an

117
118**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

alcohol and Schacht et al. teach that plasminogen activator is such the thrombin inhibitor; (ii) Ku further teaches the disclosed composition is useful for the catheter-associated medicinal applications; and (iii) Soykan et al. not only teach the t-PA coated catheter but also a method of using the catheter comprising t-PA for removing blood clot. In addition, when combined, there would have been the following advantages: (a) the composition disclosed by Ku's patent offers the benefit of reducing friction between surfaces, such as on a catheter, when implanted into the subject body (see column 4, lines 35-37) in addition to favorableness: unique and enhanced mechanical properties, thermal behavior and increased fatigue strength (see column 3, lines 37-40), (b) the process of releasing plasminogen activator for removing blood clot is highly tissue-localizable as well as time-controllable manner as taught by Soykan et al. (see column 5, lines 59-63).

Having been motivated as stated above, the skilled artisan would have readily combined the above reference teachings to arrive at the claimed invention with respect to development of composition comprising plasminogen activator formulated with antibacterial agents, e.g., an alcohol, and a process of using the composition for dissolving fibrin-bound blood clots from a catheter.

Claims 5-8 and 14-24 meet the criteria set out in PCT Article 33(2) and (3), because the prior art does not teach or fairly suggest the claimed product as in claims 14-24.

Claims 1-24 meet the requirement of PTC article 33(4), because the claimed compositions and method is useful as a pharmaceutical preparation for preventing infection in catheters with the potential for fibrin deposition.

NEW CITATIONS

US Pat. No. 6,087,375 A (BRIDON et al.) 11 July 2000.

US Pat. No. 6,231,605 B1 (KU) 15 May 2001.

UA Pat. No. 5,612,029 A (BENNETT et al.) 18 March 1997.

Facsimile Transmission

*This company uses RightFAX® fax
server software from RightFAX, Inc.*

From: **Name:** USPTO ASSIGNMENT DIVISION
 Fax Number:
 Voice Phone: 703-308-9723

To: **Name:** GENENTECH, INC.
 Company: JANET E. HASAK
 Fax Number: 16509529882
 Voice Phone:

Fax Notes:

Pg#	Description
-----	-------------

1	Cover Page
---	------------

2	301.TXT
---	---------

3	Document 1, Batch 226866
---	--------------------------

PTAS FAX PROCESSING

Date and time of transmission: Monday, November 25, 2002 9:00:36 AM
Number of pages including this cover sheet: 03

A RightFAX® Communicated Document

✓
118
226866
11/25/02



119
720

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office
ASSISTANT SECRETARY AND COMMISSIONER
OF PATENTS AND TRADEMARKS
Washington, D.C. 20231

NOVEMBER 25, 2002

PTAS

GENENTECH, INC.
JANET E. HASAK
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA 94080

700020581A

700020581A

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 703-308-9723. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, ASSIGNMENT DIVISION, BOX ASSIGNMENTS, CG-4, 1213 JEFFERSON DAVIS HWY, SUITE 320, WASHINGTON, D.C. 20231.

RECORDATION DATE: 11/22/2002

REEL/FRAME: 013262/0127
NUMBER OF PAGES: 2

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

ASSIGNOR:

SEMBA, CHARLES P.

DOC DATE: 11/21/2002

ASSIGNEE:

GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA

94080-4990

SERIAL NUMBER: 60333369
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 11/26/2001
ISSUE DATE:

ALLYSON PURNELL, EXAMINER
ASSIGNMENT DIVISION
OFFICE OF PUBLIC RECORDS

RECORDATION FORM COVER SHEET
PATENTS ONLYU.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office
Any Dkt No: PR1932

Assisting Commissioner of Patents. Please record the attached original documents or copy thereof.

1. Name of conveying party(ies):

Charles P. Semba

Additional name(s) of conveying party(ies) attached? ☐ Yes ☒ No

2. Name and address of receiving party(ies):

Name: GENENTECH, INC.

Internal Address:

Street Address: 1 DNA WayCity: South San Francisco State: CaliforniaZIP: 94080-4990Additional name(s) & address(es) attached? ☐ Yes ☒ No

3. Nature of conveyance:

☒ Assignment

Merger

Security Agreement

Change of Name

Execution Date: November 21, 2002

4. Application number(s) or patent number(s):

If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is:

A. Patent Application No.(s)

60/333,369

B. Patent No.(s)

Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No

5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed:

Janet E. Hasak

GENENTECH, INC.

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080

6. Total number of applications and patents involved: 17. Total fee (37 CFR 3.41): \$ 40.00☐ Enclosed☒ Authorized to be charged to deposit account

8. Deposit account number:

07-0630

DO NOT USE THIS SPACE

9. Statement and signature.

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document.

Janet E. Hasak
Name of Person Signing
Registration No. 28,616Janet E. Hasak
SignatureNovember 22, 2002
DateTotal number of pages comprising cover sheet, attachments and document: 3

Revised (10/11/92)

ASSIGNMENT

WHEREAS, Charles P. Semba, a citizen of U.S.A., residing at 1925 Byron Street, Palo Alto, California 94301 (hereinafter "ASSIGNOR"), has invented a new and useful invention in

CATHETER PREPARATION AND USES THEREOF

for which a provisional application Serial No. 60/333,369, if received (Docket No. PR1932) has been filed by him on 26 November 2001; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNOR have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNOR covenants and agrees to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNOR includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNOR in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNOR, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNOR hereby warrants and represents that he has not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I undersign as follows;

South San Francisco


Charles P. Semba

Dated: NOVEMBER 21, 2001

122
123

~~20~~

SUPERINDUSTRIA Y CIENCIA

Radicación: 04052140 63833890 Folios: 122
Fecha (UTC): 2024-05-03 17:27:46
Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE KRCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2820 DIVISION DE ASUNTOS COMERCIALES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ✓	()	(✓)
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	(✓)
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	(✓)
- Descripción de la invención.	()	(✓)
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	(✓)
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	(✓)
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable:

Claudia M. Nueva

Fecha:

124 123



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
SISTEMA DE REGISTRO
Fecha 23/06/2004

MANTENIMIENTO DE PROTOCOLOS

Número : 14169
Fecha : 10/11/1992
Conferido: GENENTECH,INC.

Pais : UT ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Ciudad : 517 SOUTH SAN FRANCISCO, ESTADO DE CALIFORNIA
Represent: S Sustituir: S Desistir: S
No. Radicacion : Clase: Seev: Seac:

scncia	Codigo	Ctr	Nombre
	1		RAMIRO CASTRO DUQUE
	2		BEATRIZ JARAMILLO DE LLOREDA

Encontrados (1/1) registro(s)

178
124

2020
Bogotá D C

Doctor(a)
RAMIRO CASTRO DUQUE
Apoderado
GENENTECH INC.

Oficio N° 65133

ASUNTO:

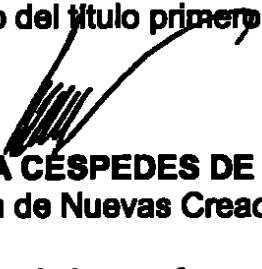
Radicación N°	04-052140
Solicitud internacional	PCT/US02/37878
Fecha inicio fase nacional	03/06/2004
Trámite	011
Evento	379
Actuación	416
Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k) Decisión 486).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,

02 JUL. 2004
202044

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Commutador: 3 820840 Fax: 3 505220
Sede CAN: Tr. 40A No. 38-50 3153265 al 69
Fax: 3 505220. Línea 9800-910 165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia