

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 032**

51 Int. Cl.:
C07K 1/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02785262 .3**
96 Fecha de presentación: **21.10.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1440082**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.07.2004**

54 Título: **PROCESADO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS: PREPARACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE PROTEÍNA Y SU ESTABILIZACIÓN.**

30 Prioridad:
22.10.2001 EP 01125048

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.01.2012

73 Titular/es:
**DOMPÉ S.P.A.
VIA CAMPO DI PILE
I-67100 L'AQUILA, IT**

72 Inventor/es:
**GENTILE, Marco;
DI PALMA, Cesare y
CESTA, Maria Candida**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 372 032 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procesado de fluidos supercríticos: preparación de micropartículas de proteína y su estabilización.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para la precipitación de proteínas y polipéptidos por procesado con fluido supercrítico y a su protección y estabilización frente a la desnaturalización.

Antecedentes de la invención

10 La necesidad de proteínas y polipéptidos estables para muchas aplicaciones está aumentando continuamente. Esto es particularmente pronunciado para proteínas terapéuticas en el campo farmacéutico. Para la facilidad tanto de los fabricantes como de los usuarios finales las disoluciones acuosas de proteínas son a menudo la forma preferida de administración. Además esta es su forma natural común que permite la formación de complejos doblados tridimensionales hidratados. Esta conformación se denomina generalmente estructura terciaria y su integridad es de vital importancia para mantener la actividad biológica de las proteínas. La pérdida irreversible de la estructura terciaria de las proteínas se denomina desnaturalización y provoca inactivación. Debido a que las proteínas y polipéptidos en disolución están expuestos a muchas tensiones que pueden provocar la degradación física (desnaturalización) y química (es decir, reacciones tales como hidrólisis, desaminación, etc.), muy a menudo se excluye el desarrollo de formulaciones líquidas. Actualmente, el modo más común de conseguir la estabilidad de la proteína es la retirada de agua por procedimientos apropiados tales como liofilización o secado por pulverización. Sin embargo, ambas técnicas (ref. "Formulation and delivery of Proteins and Peptides" J.L. Cleland and R. Langer American Chemical Society, Washington, DC, 1994) pueden incluir el desdoblamiento de la proteína. En particular con respecto a liofilización el desdoblamiento de la proteína puede ocurrir durante la etapa inicial de congelación o durante la deshidratación aguda por sublimación.

15 En lo referente al secado por pulverización, la degradación térmica, baja eficiencia, bajo rendimiento y altos niveles de humedad residual son las principales limitaciones de la técnica.

20 Otro problema es la diferencia de estabilidad a largo plazo de formulaciones análogas obtenidas por diferentes procedimientos de secado. De hecho, dependiendo del método de deshidratación, la proteína puede adoptar estructuras tridimensionales diferentes con la misma actividad biológica inicial pero diferente vida útil.

25 El documento WO 00/69887 se refiere al aislamiento de una proteína de una disolución acuosa, en el que la proteína se deshidrata simultáneamente. Esto se aplica a la preparación de microcristales de proteína revestida.

30 El efecto estabilizante de los carbohidratos y en particular de la trehalosa sobre proteínas durante la congelación y deshidratación está bien documentado ("Formulation and Delivery of Proteins and Peptides" J.L. Cleland and R. Langer American Chemical Society, Washington, DC 1994 and "Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products" L. Rey and J.C. May, Marcel Dekker, Inc. New York 1999). Aunque muchos azúcares pueden prevenir el daño a la proteína durante la deshidratación, los productos a menudo tienen una vida útil corta a temperatura ambiente debido a la reacción de Maillard. La estabilidad a temperatura ambiente se puede mejorar usando azúcares no reductores tales como sacarosa y trehalosa.

35 La solicitud de patente británica GB 2009198 describe la liofilización de polisacárido meningocócico y trehalosa; el documento GB2126588 describe la estabilización de factor de necrosis tumoral (TNF) por liofilización y congelación incluyendo un tensioactivo no iónico o trehalosa (u otro azúcar); y la solicitud de patente japonesa J 58074696 describe la liofilización de ATP en presencia de trehalosa.

40 Se dice que las preparaciones de fosfatasa alcalina que contienen trehalosa mantienen su actividad después de la liofilización y mantienen alrededor de 70% de la actividad inicial después de 84 días de almacenamiento a 45°C (A.W: Ford et al., J. Pharm. Pharmacol. 1993, 45: 86-93). Aunque la liofilización es aún el principal procedimiento usado para secar proteínas, se deben tomar varias precauciones para evitar el daño que pueden provocar las fases de tensión severa tales como congelación-descongelación y secado. De hecho, durante la primera etapa en la formulación de proteínas liofilizadas, una correcta elección de las condiciones (pH, fuerza iónica, presencia de estabilizantes, etc.) garantiza la mejor protección contra el desdoblamiento de proteínas y la inactivación. Se sabe que muchos excipientes tales como azúcares, aminoácidos, polímeros, ligandos específicos de tensioactivos (substratos, cofactores, modificadores alostéricos, etc.) estabilizan proteínas durante la liofilización y han sido denominados "lioprotectores". Entre ellos, han sido muy estudiados carbohidratos y en particular disacáridos tales como sacarosa y trehalosa. El mecanismo de estabilización de estos compuestos así como de otros estabilizantes no se ha clarificado completamente. Sin embargo, un lioprotector efectivo debe mantener la estabilidad tanto durante la congelación-descongelación como durante el secado. Dado que el medio de la proteína es acuoso durante mucha parte del procedimiento de congelación, los solutos que estabilizan la conformación nativa en disoluciones acuosas son muy a menudo efectivos como crioprotectores de proteínas. Son ejemplos los carbohidratos y algunos aminoácidos. Arakawa et al. (J. Pharm. Res. 1991, 8, 285-291) publicaron que tales solutos tienden a ser excluidos de la superficie de la proteína cuando está en disolución acuosa. La consecuencia termodinámica de tal fenómeno

es la estabilización de la conformación nativa de la proteína.

La estabilidad durante el secado y almacenamiento se explica mejor tanto por la sustitución de agua como por la hipótesis de vitrificación. La primera afirma que los estabilizantes interactúan con la proteína como lo hace el agua reemplazando al agua retirada y dan cuenta del control termodinámico del procedimiento de secado. La última afirma que los estabilizantes son buenos formadores de vidrio y permanecen amorfos durante y después del secado de modo que inmovilizan mecánicamente las proteínas dentro de una matriz vítrea. Este es un argumento puramente cinético que funciona igualmente bien tanto para la estabilidad de secado como para la de estabilidad de almacenamiento ("Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products" L. Rey and J. C. May, Marcel Dekker, Inc. New York 1999).

Por consiguiente, refiriéndonos a la anterior hipótesis de estabilización de proteínas secas, se puede postular que la vitrificación es una de las principales cuestiones para la estabilidad a largo plazo. El uso de secado por pulverización para la desecación de proteínas ha sido menos investigado. Aunque se pueden producir partículas amorfas finas, este procedimiento requiere aire caliente como fuerza de secado que puede conducir a la degradación térmica de la proteína. Además, otras limitaciones son la baja eficiencia, bajo rendimiento y altos niveles de humedad residual.

Otra técnica publicada para secar proteínas que debería evitar la inactivación es la deshidratación al aire a temperatura ambiente. El documento US 4.891.319 de Quadrant Bioresources Ltd (UK) describe la conservación de varias proteínas y otras macromoléculas a 37-40°C secando en presencia de trehalosa a presión atmosférica.

El documento US 5874029 describe un método y aparato para la producción de micro y nanopartículas, usando un fluido supercrítico en gotas atomizadas para eliminar el disolvente y producir partículas. Se usa un procedimiento GAS.

El uso de tecnología de fluido supercrítico se ha citado también como método útil para obtener proteínas en forma de micropartículas finas secas. Las principales ventajas de esta técnica son la posibilidad de mantener la proteína en un medio acuoso favorable antes de una rápida precipitación para minimizar la desnaturalización y la duración del procedimiento que es más corta que la liofilización y menos cara. Jung et al. han revisado el diseño de partículas usando fluidos supercríticos en su artículo (J. Supercritical Fluids, 20 (2001), pp. 179-219).

S.P. Sellers et al. (J. Pharm. Sci., 2001, 90, 785-797) publican un método de deshidratación para la producción de polvo de proteína basado en la nebulización asistida por CO₂ supercrítico. Esta técnica se puede asimilar a secado por pulverización; de hecho se usa CO₂ supercrítico para mejorar la nebulización de la disolución y no como anti-disolvente para la precipitación de soluto.

El procedimiento GAS (recristalización en gas antidisolvente) para formar micropartículas de proteína está publicado por Debenedetti (US 6.063.910). En este caso la disolución de proteína se pulveriza a través de un disco de platino perforado por laser con un diámetro de 20 µm y una longitud de 240 µm dentro del recipiente de formación de partículas previamente lleno del fluido supercrítico que se introduce por una entrada diferente. Esta técnica se ha usado para formar partículas de catalasa e insulina (0,01% peso/v) en disoluciones de etanol/agua (9:1 v/v) usando dióxido de carbono como fluido supercrítico. En este procedimiento, la entrada de fluido supercrítico no está optimizada: la inyección de la disolución ocurre en una atmósfera casi estática de fluido supercrítico, con baja turbulencia. Hanna M. and York P. (WO96/00610) propusieron un nuevo método y un nuevo aparato para obtener partículas muy pequeñas por una técnica de fluido supercrítico específica denominada SEDS (Dispersión mejorada de la disolución por disolución supercrítica).

El procedimiento está basado en una nueva boquilla coaxial: la disolución se expande a través de una entrada capilar, el fluido supercrítico se expande a través de un camino coaxial externo con un extremo en forma cónica. La mezcla entre fluido supercrítico y la disolución ocurre en la zona cónica. También proponen el uso de una boquilla de tres vías: se puede alimentar un modificador para mejorar la mezcla. Aplicaron la tecnología SEDS a la precipitación de pequeñas partículas de compuestos solubles en agua, tales como azúcares (Lactosa, Maltosa, Trehalosa y Sacarosa) y proteínas (R-TEM beta-lactamasa). La coprecipitación de proteínas y estabilizantes ni se menciona ni se ejemplifica en él.

Además, los mismos inventores (WO 01/03821) describen un método de precipitación mejorada usando el mismo aparato pero alimentando al recipiente de formación de partículas un fluido supercrítico y dos disolventes inmiscibles. Este método permite la coprecipitación de dos o más solutos disueltos en los dos disolventes inmiscibles. La entrada de los fluidos está formada por una boquilla coaxial en la que el contacto entre los dos disolventes ocurre poco antes de su dispersión por el antidisolvente supercrítico, evitando la precipitación de solutos dentro de la boquilla. Sin embargo este método permite la formación de coprecipitados homogéneos; es generalmente útil cuando se deben procesar dos solutos con diferente polaridad. Además, si este se usa para una disolución acuosa, el segundo disolvente debe ser por lo menos parcialmente soluble en agua de modo que permita que el agua se disperse en el antidisolvente supercrítico. Esta etapa es necesaria para permitir la precipitación de soluto soluble en agua. La coprecipitación de proteínas y estabilizantes no se describe en este documento.

El documento US 5770559 describe la solubilización de sustancias farmacéuticas en un disolvente orgánico y la

preparación de polvo farmacéutico de este modo. Un polímero biodegradable se puede codisolver con la sustancia farmacéutica, seguido de precipitación por GAS.

5 Walker (WO01/15664) describe un método para coformular una sustancia activa (preferentemente una farmacéuticamente activa) y un excipiente oligomérico o polimérico en el que una cantidad entre 80 y 100% de la sustancia activa está en forma amorfa a diferencia de la forma cristalina. En estas formulaciones las sustancias activas son más estables comparadas con las formas cristalinas cuando se almacenan a temperatura entre 0 y 10°C. Solo se describe la coformulación de una sustancia activa farmacéutica con un excipiente oligomérico o polimérico y no se menciona la estabilización de la proteína en este documento. La estabilización de la proteína se consigue por lo tanto en la técnica por medio de liofilización y secado por pulverización. La coprecipitación de proteínas con estabilizantes usando fluidos supercríticos no se ha descrito antes y es el objetivo de la presente invención.

10 Hemos encontrado ahora un método para producir micropartículas de proteína seca estable por coprecipitación con un estabilizante usando fluidos supercríticos. Los estabilizantes preferidos son carbohidratos, aminoácidos, tensioactivos y polímeros. Más preferentemente el estabilizante es un azúcar, lo más preferentemente trehalosa.

15 La coprecipitación permite las interacciones íntimas entre la proteína y las moléculas estabilizante y existe una relación óptima peso/peso para cada pareja proteína/estabilizante.

20 De hecho dado que no hay congelación-descongelación no hay necesidad de crioprotección. Además, aunque la naturaleza de las interacciones proteína/estabilizante tienen que ser mejor aclaradas, en el presente caso el estabilizante juega el papel principal de mejorar la estabilidad de almacenamiento en lugar del de retener la actividad de la proteína durante el secado. De hecho, la precipitación por un fluido supercrítico permite por si misma la producción de partículas de proteína sin desnaturalización durante el procedimiento de secado.

Enunciados de la invención

La expresión "fluido supercrítico" quiere decir un fluido en o por encima de su presión crítica y su temperatura crítica.

El término "disolvente" quiere decir un líquido que es capaz de formar una disolución con la proteína y el estabilizante.

25 El término "estabilizante" quiere decir un excipiente farmacéutico sólido que es capaz de estabilizar, por ejemplo, proteínas, que es soluble en el disolvente y que es substancialmente insoluble en el fluido supercrítico.

El término "modificador" es una sustancia, preferentemente un disolvente, que mejora la solubilidad del "disolvente" en el fluido supercrítico.

30 La presente invención proporciona un procedimiento para la coprecipitación de una proteína o polipéptido con un estabilizante para ellos, por un procedimiento de antidisolvente GAS que comprende introducir en un recipiente de formación de partículas un fluido supercrítico mezclado con un modificador; y

una disolución que comprende dicha proteína o polipéptido y dicho estabilizante disuelto en un disolvente;

35 de modo que dicho disolvente se extraiga de la disolución por medio de dicho fluido supercrítico y ocurre la coprecipitación de la sustancia y estabilizante, en el que dicho estabilizante es trehalosa, dicho disolvente es agua, dicho fluido supercrítico es dióxido de carbono y dicho modificador se selecciona de metanol, etanol e isopropanol.

40 La disolución se introduce en el recipiente de formación de partículas mezclada con un modificador. El procedimiento incluye la introducción en un recipiente de formación de partículas de una disolución o suspensión de la sustancia y el estabilizante y un fluido supercrítico. En el recipiente de formación de partículas, ocurre la mezcla del fluido supercrítico con la disolución y la extracción del disolvente por el fluido supercrítico de modo que los solutos (sustancia y estabilizante) coprecipitan en forma de partículas finas. El modificador es un compuesto que es soluble tanto en el disolvente como en el fluido supercrítico.

45 Más preferentemente, se usa el aparato en la figura 1. En este caso, la disolución de sustancia y estabilizante, el fluido supercrítico y el modificador se introducen separadamente en el recipiente de formación de partículas en flujo contracorriente por la boquilla 27. Tal boquilla WO 02/68107, que se muestra en las figuras 2 y 3, proporciona entradas separadas para el fluido supercrítico y la disolución. De hecho, esta es un disco con un orificio en su centro y dos o más orificios a la misma distancia del centro y uniformemente espaciados a lo largo de una circunferencia. Todos los orificios comunican con el interior del recipiente de formación de partículas. La disolución se introduce en el recipiente de formación de partículas a través del recipiente central, mientras que el fluido supercrítico, puro o con el modificador, se introduce a través de los orificios exteriores.

50 El modificador y el fluido supercrítico se mezclan antes de la introducción en el recipiente de formación de partículas. En otra versión del procedimiento el modificador se introduce en el recipiente de formación de partículas en parte con la disolución y en parte con el fluido supercrítico.

La sustancia es una proteína o compuesto polipéptido de interés farmacéutico o de diagnóstico, soluble en el disolvente y en la mezcla disolvente/modificador y substancialmente insoluble en el fluido supercrítico.

5 El estabilizante es preferentemente un excipiente farmacéutico que es capaz de estabilizar la sustancia en el producto coprecipitado. El estabilizante es soluble en el disolvente y en la mezcla disolvente/modificador y substancialmente insoluble en el fluido supercrítico. El estabilizante es trehalosa. Se puede emplear también una mezcla de estabilizantes.

El disolvente es agua.

El fluido supercrítico es dióxido de carbono.

El modificador es etanol, metanol o isopropanol.

10 Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un diagrama de flujo esquemático del aparato usado para llevar a cabo el procedimiento según esta invención.

Las figuras 2 y 3 muestran la boquilla que se usa para llevar a cabo el procedimiento según esta invención.

15 Las figuras 4, 5 y 6 muestran las distribuciones de tamaños de partículas de polvos de lisozima/trehalosa coprecipitadas con CO₂ supercrítico a las relaciones peso/peso 1:10, 1:2 y 1:0, respectivamente.

La figura 7 muestra los termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de polvos de lisozima/trehalosa coprecipitadas con CO₂ supercrítico frente a los respectivos productos puros.

Descripción detallada de la invención

20 La invención se describirá adicionalmente con particular referencia a la sustancia que es una proteína. Se ha encontrado que es posible producir micropartículas de proteína/estabilizante secas estables por el uso de fluidos supercríticos.

25 Sorprendentemente, se ha encontrado que la coprecipitación usando fluidos supercríticos permite interacciones íntimas particulares entre proteína y moléculas de estabilizante y que para cada pareja proteína/estabilizante hay una relación en peso óptima. Si la cantidad de estabilizante excede de la cantidad óptima, el exceso no interacciona directamente con la proteína sino que en su lugar forma partículas de estabilizante puro. Este comportamiento se ha evidenciado por microscopía y por análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC).

El procedimiento para la coprecipitación de una sustancia con un estabilizante por un procedimiento GAS que comprende el uso de un fluido supercrítico mezclado con un modificador y una disolución en un recipiente de formación de partículas se puede llevar a cabo por medio del aparato citado en la Figura.

30 Una ventaja del aparato en la figura 1 se refiere al contacto entre fluido supercrítico y disolución dado que este tiene lugar solo en el recipiente de formación de partículas. Por consiguiente no puede ocurrir ninguna precipitación de polvo dentro de la boquilla y provocar una obstrucción. Importantemente el fluido supercrítico actúa como anti-disolvente pero también promueve la conversión de la disolución en una pulverización fina a medida que entra en el recipiente de formación de partículas. Esto amplía la interfase disolución/antidisolvente y permite una mezcla más rápida de las dos fases y por consiguiente una rápida precipitación de proteína sin ninguna desnaturalización. Además, la mejora de la velocidad de transferencia de masa entre la disolución y el fluido supercrítico permite el funcionamiento en condiciones suaves de temperatura y presión lo que contribuye a evitar cualquier posible desnaturalización de la proteína. El aparato de la Figura 1 incluye un recipiente 22 de formación de partículas. Este es un recipiente estándar de formación de partículas de un volumen apropiado. La temperatura en el recipiente se mantiene constante por medio de una camisa calefactora 21. La presión en el recipiente se controla por medio de una microválvula 25 de medida.

La temperatura y la presión en el recipiente de formación de partículas se miden por medio de un termopar 29 y un transductor 30 de presión.

45 Las partículas formadas son retenidas por el filtro 23. Este es una canasta de acero inoxidable, cuyo fondo está hecho de un disco (0,5 µm) de acero inoxidable sinterizado. Se coloca a la salida del recipiente un segundo filtro 24 (0,5 µm).

50 El fluido supercrítico se retira del cilindro 1, se condensa por medio del refrigerador 4 y se bombea por medio de la bomba 8 al recipiente de formación de partículas a través de la conducción 34. Previamente a la entrada en el recipiente de formación de partículas, el fluido supercrítico se calienta hasta la temperatura deseada por medio del precalentador 14 y el calentador 17. El precalentador 14 actúa también como amortiguador de pulsaciones. El fluido supercrítico se filtra también por medio del filtro 15 (0,5 µm). La temperatura y presión del fluido supercrítico

previamente a la entrada en el recipiente de precipitación se miden por medio del termopar 29 y el transductor de presión 30, respectivamente.

5 El modificador se retira del depósito 2, se bombea por medio de la bomba 9 a la conducción 34 y se mezcla con el fluido supercrítico previamente a la entrada en el recipiente de formación de partículas. El modificador se filtra también por medio del filtro 12 (0,5 μm).

La conducción 34 está equipada con una válvula 16 de escape.

La disolución se retira del depósito 3, se bombea por medio de la bomba 10 hasta el recipiente de formación de partículas a través de la conducción 6. La disolución se filtra también por medio del filtro 13 (0,5 μm).

10 En otra versión del procedimiento, el modificador se puede introducir en el recipiente de formación de partículas en parte con la disolución y en parte con el fluido supercrítico. El fluido supercrítico, mezclado con el modificador, y la disolución se alimentan al recipiente de formación de partículas por medio de la boquilla 27.

15 Aguas abajo del recipiente 22 de precipitación, la mezcla de fluido supercrítico, modificador y disolvente se filtran por medio del filtro 24 (0,5 μm) para retener las partículas que no son retenidas finalmente por el filtro 23. La mezcla de fluido supercrítico, modificador y disolvente se despresuriza por medio de la microválvula 25 de medida, el disolvente supercrítico se separa del modificador y el disolvente en el separador 26, su caudal se mide por medio del medidor de caudal de masa 31 y se descarga.

20 La boquilla que se muestra en la figura 2 y 3 permite la introducción de la disolución y del fluido supercrítico, puro o mezclado con el modificador, en el recipiente de formación de partículas en flujo en contracorriente. Las velocidades de la disolución y del fluido supercrítico a la salida de la boquilla están relacionadas con el caudal másico y con el diámetro de los orificios. Además, se prefiere que la energía de presión tanto de la disolución como del fluido supercrítico se convierta en energía cinética con una mínima pérdida de energía. La boquilla de las figuras 2 y 3, de hecho, estaba diseñada para este propósito. La peculiaridad de esta boquilla es que la expansión de la disolución y del fluido supercrítico ocurre a través de orificios. Un orificio está caracterizado por una relación de longitud a diámetro de 5 a 10. Tiene la ventaja sobre el capilar de minimizar la pérdida de energía de presión y de convertir eficientemente la energía de presión en energía cinética. La boquilla tiene orificios con diámetros que varían de 0,02 a 0,04 mm y longitud que varía de 0,1 a 0,2 mm. Tales dimensiones permiten muy altas velocidades en la salida del orificio tanto para la disolución como para el fluido supercrítico.

La boquilla puede ser de acero inoxidable, o de cualquier otro material apropiado.

30 La boquilla es un disco con un orificio 39 en su centro y dos o más orificios 41 perforados a la misma distancia del centro y uniformemente espaciados a lo largo de una circunferencia. Los orificios comunican con el interior del recipiente de formación de partículas. La disolución se introduce en el orificio de formación de partículas a través del orificio central, el fluido supercrítico, puro o con el modificador, se introduce a través de los orificios exteriores. La disolución 37 pasa a través de un camino de diámetro D3. Su extremo tiene una forma 40 cónica. En el vértice del extremo 40 cónico hay un orificio 39 perforado con láser. La longitud del L1 del orificio central es de 5 a 10 veces su diámetro D1. El diámetro D1 se puede escoger de tal forma como para obtener cualquier velocidad deseada de la disolución en la salida del orificio.

35 El fluido 38 supercrítico pasa a través de pasos de diámetro D4. Cada extremo de paso tiene una forma 42 cónica. En el vértice del extremo 42 cónico hay un orificio 41 perforado con láser. La longitud 21 del orificio es de 5 a 10 veces su diámetro D2. El diámetro D2 se puede escoger de tal modo que se obtenga cualquier velocidad deseada del fluido supercrítico a la salida del orificio.

La relación entre la longitud (L1 o L2) y diámetro (D1 o D2) de los orificios 39 y 41 se escoge para establecer en un mínimo la pérdida de energía y para obtener más altas velocidades convirtiendo la energía de presión en energía cinética.

45 La disolución emerge del orificio 39 central a alta velocidad y se rompe en gotas finas al ponerse en contacto con el fluido supercrítico. La dispersión del chorro de líquido de disolución se mejora con el fluido supercrítico que emerge de los orificios 41, con tal de que la velocidad del fluido supercrítico sea muy alta, del orden de magnitud de la velocidad del sonido a la temperatura y presión de trabajo. El efecto del fluido supercrítico para mejorar la dispersión del chorro de líquido de disolución es crucial y determina la forma, tamaño y rendimiento del producto.

50 Se pueden perforar orificios con diámetros decrecientes hasta 0,02 mm. Las boquillas que se han usado para llevar a cabo los ensayos tienen orificios de diámetro que varía de 0,02 a 0,04 mm. En otra realización de la invención, uno o más de los orificios exteriores están perforados de tal modo que sus ejes convergen sobre el eje del orificio central. El ángulo formado por el eje de los orificios exteriores con el eje del orificio central está entre 1 y 30°.

55 Un punto crucial en el procedimiento para la formación de micropartículas finas de proteína seca es la mezcla de la disolución con el fluido supercrítico: una mezcla rápida e íntima provoca la precipitación de partículas con un pequeño diámetro y permite un alto rendimiento de polvo.

Para tener una buena mezcla, la disolución se debe dispersar en el fluido supercrítico en forma de gotas pequeñas, proporcionando de este modo alta área interfacial para transferencia de masa y un camino corto para la difusión del fluido supercrítico en las gotas de disolución y prevenir por ello el crecimiento de partículas de soluto. Además, una alta relación entre el caudal de fluido supercrítico y el caudal de disolución provoca un gran exceso de fluido supercrítico respecto a la disolución en el momento de su contacto, mejorando la fuerza conductora para la transferencia de masa del fluido supercrítico a la disolución y del disolvente en el fluido supercrítico.

Cuando la solubilidad del disolvente en el fluido supercrítico es baja, el uso de un modificador permite una mejor mezcla entre disolución y fluido supercrítico.

La relación de caudal de modificador y caudal de disolución se tiene que elegir de modo que se obtenga un alto incremento de solubilidad del disolvente en el fluido supercrítico. El modificador se puede introducir con el fluido supercrítico o en parte con el fluido supercrítico y en parte con la disolución. El modo de introducción del modificador influye enormemente en la extracción del disolvente y la estructura de las partículas que se forman.

Para la precipitación de polvos en disolución acuosa usando dióxido de carbono como disolvente supercrítico y etanol como modificador la relación entre caudal de fluido supercrítico y caudal de modificador está preferentemente dentro del intervalo 4-8, más preferentemente 7, mientras que la relación entre caudal de modificador y caudal de disolución está preferentemente dentro del intervalo 15-25 y más preferentemente 20.

Como se señaló anteriormente, es necesario tener una buena dispersión de la disolución en el fluido supercrítico para obtener gotas muy pequeñas de disolución.

El tamaño de las gotas de disolución formadas se determina por las condiciones fluidodinámicas en la zona de mezcla y por las propiedades físicas de la disolución y el disolvente supercrítico, tales como viscosidad, tensión superficial, densidad. Estas propiedades están enormemente influidas por la temperatura y presión del fluido supercrítico.

Las entradas de fluido supercrítico están situadas alrededor de la entrada de la disolución a muy corta distancia de ella (alrededor de 3 mm): esta configuración permite que la disolución se energice por el fluido supercrítico mejorando de este modo la dispersión de la disolución en gotas muy finas, proporcionando alta superficie interfacial entre las dos fases y rápida extracción del disolvente en el fluido supercrítico. Estos fenómenos son particularmente eficientes cuando la velocidad del fluido supercrítico en la salida del orificio llega a o es mayor que la velocidad del sonido provocando la formación de un disco de Mach y la dispersión de la disolución en forma de gotas muy finas (Matson D.W., Fulton J.L., Petersen R.C., Smith R.D., "Rapid expansion of supercritical fluid solutions: solute formation of powders, thin films, and fibers" Ind. Eng. Chem. Res., 1987, 26, 2298-2306). La velocidad del sonido en un fluido depende considerablemente de la presión y la temperatura: el valor mínimo de la velocidad del sonido para dióxido de carbono en la región supercrítica es 208 m/s a 8 MPa y 40°C. Para aprovechar el fenómeno anteriormente mencionado es conveniente trabajar alrededor del valor de la velocidad del sonido para dióxido de carbono en la región supercrítica, por ejemplo, 208 m/s a 8 MPa y 40°C.

Para la producción de polvos finos a partir de disoluciones acuosas con el procedimiento GAS usando dióxido de carbono como disolvente supercrítico y etanol como modificador, se encontró que las condiciones óptimas de funcionamiento son 8-12 MPa y 35-50°C. En el aparato experimental usado para llevar a cabo los ensayos experimentales, el caudal másico del fluido supercrítico era 30 g/min, el caudal de disolución 0,2 g/min, y el caudal másico del modificador 4 g/min, habiendo establecido la relación de caudal másico de fluido supercrítico a disolución en 7 y la relación de caudal másico de modificador a disolución en 20 y la velocidad de fluido supercrítico en la salida de la boquilla a alrededor de 300 m/s. Usando este aparato llevamos a cabo el procedimiento para producir micropartículas secas estables de una sustancia y un estabilizante por coprecipitación por GAS. Se usaron proteínas tales como fosfatasa alcalina y lisozima como sustancia y trehalosa como estabilizante. Se produjeron polvos coprecipitados a diferente relación proteína/estabilizante. El rendimiento de polvo recogido era 90%. Se encontró que la actividad enzimática retenida después del procedimiento estaba dentro de 95% a 100%, comparado con el reactivo comercial sin procesar. Las distribuciones de tamaños de partículas de estos polvos mostraron que más de 90% de las partículas tienen un diámetro equivalente menor de 10 µm dentro de una estrecha distribución de tamaños. Además, la caracterización quimicofísica mostró que la coprecipitación permite interacciones íntimas entre las moléculas de proteína y estabilizante y para cada pareja proteína/estabilizante hay una relación peso/peso óptima. Finalmente, estudios de estabilidad mostraron que las partículas coprecipitadas de fosfatasa alcalina/trehalosa eran más estables que el producto equivalente liofilizado.

Procedimiento experimental

El fluido supercrítico se alimenta al recipiente de precipitación por medio de la bomba 8, que se usa para establecer el caudal de fluido supercrítico. La temperatura del fluido supercrítico en la conducción se establece por medio del calentador 17 hasta un valor más alto que la temperatura dentro del recipiente de formación de partículas, para tener en cuenta la disminución de temperatura debida a la expansión a través de los orificios de la boquilla. El modificador se añade a continuación con un caudal predeterminado al fluido supercrítico por medio de la bomba 9. La disolución de proteína y estabilizante se bombea por medio de la bomba 10 dentro del recipiente de formación de

partículas cuando se alcanzan condiciones de estado estacionario.

Después de que se alimenta cierta cantidad de disolución al recipiente de formación de partículas, se detienen las bombas 9 y 10 y solo se alimenta el fluido supercrítico al recipiente de formación de partículas con tal de que el polvo precipitado esté libre de disolvente y modificador.

- 5 El recipiente de formación de partículas se despresuriza, el polvo se recupera y sella en viales de 10 ml en nitrógeno seco.

La estabilidad de las proteínas coprecipitadas se ensayó almacenando viales en las siguientes condiciones:

- 10 25°C-60% de HR; 30°C- 65% de HR; 40°C- 75% de HR. Cada muestra se analizó para ver su actividad biológica a t= 0, 1, 2, 3 y 6 meses. Como comparación, se realizó un estudio paralelo de proteína precipitada por fluidos supercríticos tal como está, en productos liofilizados análogos y en el producto comercial sin procesar, todos almacenados en nitrógeno seco.

Ejemplo 1

Preparación de partículas coprecipitadas de fosfatasa alcalina (ALP)/trehalosa

En este ejemplo, se usa el método de la invención para coprecipitar mezclas de fosfatasa alcalina (ALP) y trehalosa.

- 15 Se usaron disoluciones que contienen ALP (SIGMA Chemicals) a concentración 0,2% peso/peso y trehalosa (SIGMA Chemicals) a concentración dentro del intervalo 0-2% peso/peso en agua desionizada.

Las relaciones ALP/trehalosa de los polvos obtenidos eran las siguientes: 1:10, 1:2 y 1:0. Se usaron dióxido de carbono como fluido supercrítico y etanol como modificador.

- 20 La disolución se alimentó al recipiente 22 de formación de partículas por medio de la bomba 10 a un caudal de 0,2 g/min. Se alimentó dióxido de carbono supercrítico por medio de la bomba 9 a la conducción 34 a un caudal de 4 g/min y se mezcló con dióxido de carbono supercrítico previamente a la entrada en el recipiente de formación de partículas.

- 25 El fluido supercrítico se inyectó en el recipiente de formación de partículas a través de los cuatro orificios externos de la boquilla, cada uno con un diámetro de 0,04 mm. La solución se inyectó en el recipiente de formación de partículas a través del orificio central de la boquilla, que tiene un diámetro de 0,04 mm. La longitud de todos los orificios era 0,2 mm.

- 30 La temperatura y la presión dentro del recipiente de formación de partículas se mantuvieron a 40°C constantes, por medio de la camisa calefactora 21, y de 100 ±1 bar por medio de la microválvula 25 de regulación de medida, respectivamente. Las partículas precipitadas se recogieron sobre el filtro 23 en el fondo del recipiente de formación de partículas, mientras que el fluido supercrítico, modificador y agua se recogieron en el cilindro 26 a presión atmosférica.

- 35 Se efectuó el procedimiento con tal de que se obtuviese una cantidad suficiente de polvo. Después de que se detuvieron las alimentaciones de disolución y modificador y solo se alimentó dióxido de carbono puro dentro del recipiente de formación de partículas para extraer cualquier resto de disolvente y modificador de los polvos precipitados. Típicamente, el recipiente de formación de partículas se lavó con dos volúmenes de dióxido de carbono para obtener polvos secos.

Después de la despresurización, el recipiente de formación de partículas se abrió y se recuperaron los polvos y se almacenaron en viales de 10 ml en nitrógeno seco.

El rendimiento del polvo recogido era 90%.

- 40 La actividad enzimática residual de ALP estaba dentro del 95% y 100%, comparada con el reactivo comercial sin procesar. El análisis de microscopía óptica del polvo muestra que con alto contenido de trehalosa como para la relación de ALP/trehalosa 1:10 el polvo está formado por dos poblaciones diferentes de partículas: una, que es la más frecuente, está formada por partículas en forma de aguja, mientras que la otra por partículas de forma redonda. Las partículas de forma de aguja son bastante similares a las obtenidas por trehalosa cuando se precipita por CO₂ supercrítico. Los polvos de más bajo contenido de trehalosa muestran solo la población de partículas de forma redonda: De este modo, la trehalosa se puede coprecipitar con ALP por CO₂ supercrítico para dar un tipo de partículas solo con los más bajos contenidos de trehalosa (relaciones proteína/trehalosa 1:2). Se encontró un comportamiento similar para coprecipitados de lisozima/trehalosa (véase el ejemplo 2). En este caso la actividad enzimática residual encontrada de ALP estaba dentro de 95% y 104%, comparada con el reactivo comercial sin procesar.
- 50

Se prepararon viales similares que contienen ALP comercial sin procesar o productos liofilizados análogos, todos en

nitrógeno seco.

Estudio de estabilidad

5 Se colocaron varios viales de cada categoría en cada una de las condiciones siguientes: 25°C- 60% HR; 30°C-65% HR; 40°C-75% HR durante 6 meses. A t=0, 1, 2, 3, 6, meses, se analizaron los contenidos de los viales para ver la actividad de la ALP. Los resultados de los estudios de estabilidad se resumen en la Tabla 1.

La ALP pura precipitada por CO₂ supercrítico (muestra P6) muestra una disminución de la actividad enzimática en todas las condiciones. La actividad residual después de 6 meses a 40°C-75% HR (las condiciones más extremas) es el 57% del valor para t=0.

10 Por el contrario, no se encontró pérdida de actividad significativa en todas las condiciones hasta 6 meses para ALP/trehalosa coprecipitada por CO₂ supercrítico con la relación 1:10 (muestra FT8).

15 A 40°C-75% HR, la ALP liofilizada (muestra F8) y el producto comercial SIGMA muestran disminuciones similares y solo el 43% y el 42% de la actividad enzimática inicial se retuvo después de 6 meses. En las otras condiciones, en cambio, el producto SIGMA muestra una pérdida de actividad más lenta que la ALP pura liofilizada. De hecho después de 6 meses se detectaron las siguientes actividades enzimáticas residuales: 95% frente a 83% a 25°C-60% HR, y 86% frente a 76% a 30°C- 65% HR.

Finalmente, el polvo liofilizado que tiene la relación ALP/trehalosa 1:10 (muestra FT10) mostró una rápida pérdida de actividad inicial, a continuación una más lenta hasta seis meses que parece ser independiente de las condiciones de almacenamiento. De hecho las actividades enzimáticas retenidas a 25°C-60% HR, 30°C-65% HR y 40°C-75% HR son 90%, 88% y 90% respectivamente del valor inicial.

20 Ejemplo 2

Preparación de partículas de coprecipitado de lisozima/trehalosa

En este ejemplo, el método de la invención se usa para preparar polvos de coprecipitado usando lisozima y trehalosa.

25 Se usaron disoluciones que contienen lisozima (SIGMA Chemicals) a una concentración dentro de 0,2-1% peso/peso y trehalosa (SIMA Chemicals) a una concentración dentro del intervalo 0-2% peso/peso en agua desionizada. Las relaciones lisozima/trehalosa de los polvos obtenidos eran las siguientes 1:10, 1:5, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1 y 1:0 (Tabla 2).

Se usó dióxido de carbono como fluido supercrítico y etanol como modificador.

30 La disolución acuosa que contiene la enzima y el estabilizante se alimentaron al recipiente 22 de formación de partículas por medio de la bomba 10 con un caudal de 0,2 g/min. El dióxido de carbono supercrítico se alimentó por medio de la bomba 8 con un caudal de 30 g/min, se alimentó etanol por medio de la bomba 9 a la conducción 34 con un caudal de 4 g/min y se mezcló con dióxido de carbono supercrítico antes de entrar en el recipiente de formación de partículas.

35 El fluido supercrítico se inyectó en el recipiente de formación de partículas a través de los cuatro orificios externos de la boquilla, cada uno con un diámetro de 0,04 mm. La disolución se inyectó en el recipiente de formación de partículas a través del orificio central de la boquilla, que tiene un diámetro de 0,04 mm. La longitud de todos los orificios era 0,2 mm.

40 La temperatura y presión dentro del recipiente de formación de partículas se mantuvieron constantes a 40°C, por medio de la camisa calefactora 21, y a 100±1 bar por medio de la microválvula 25 de regulación de medida, respectivamente.

Las partículas precipitadas se recogieron en el filtro 23 en el fondo del recipiente de formación de partículas, mientras que el fluido supercrítico, modificador, agua y soluto finalmente no precipitado se recogieron en el cilindro 26 a presión atmosférica.

45 Después de eso, se alimentó una cierta cantidad de soluto al recipiente de formación de partículas, se detuvieron las bombas 9 y 10 y solo se alimentó fluido supercrítico al recipiente de formación de partículas para secar los polvos precipitados: típicamente, se requiere alrededor de dos veces el volumen del recipiente de formación de partículas para obtener polvos secos.

En este momento, se despresurizó el recipiente de formación de partículas, se abrió y se recogieron los polvos.

El rendimiento de polvos recogidos era 90%.

50 La actividad enzimática residual encontrada de la lisozima estaba dentro de 96% y 100%, comparada con el reactivo

comercial sin procesar.

5 La tabla 2 expone para cada muestra la relación lisozima/trehalosa, la actividad enzimática retenida, el contenido de proteína que está relacionado con la homogeneidad de la precipitación, el número de poblaciones de partículas y los tamaños de partículas. Como se puede advertir, para todas las muestras, tanto la actividad enzimática como el contenido de proteína están muy cerca de los valores teóricos. De este modo las condiciones experimentales que usamos permitieron una precipitación similar tanto para la proteína como para el azúcar y garantizaron una recuperación de la actividad biológica casi completa.

10 Las distribuciones de tamaños de partículas de los polvos calculadas por los análisis de imágenes de microfotografías de SEM mostraron que para todos los polvos obtenidos por precipitación por CO₂ supercrítico, más del 90% de las partículas tienen un diámetro equivalente menor de 10 µm con una estrecha distribución de tamaños. Las figuras 4, 5, 6 muestran las distribuciones de tamaños de partículas de CO₂ supercrítico coprecipitado con relaciones de lisozima/trehalosa 1:10, 1:2 y 1:0, respectivamente. Los otros coprecipitados dieron similares distribuciones. Además, la observación de los polvos por análisis de microscopía óptica mostró que a altos contenidos de trehalosa tales como para ambas relaciones de lisozima/trehalosa 1:10 y 1:5, los polvos estaban compuestos de dos poblaciones de partículas: la una, que en gran parte era la más frecuente, estaba formada por partículas en forma de aguja, la otra estaba formada por partículas de forma redonda. Las partículas de forma de aguja eran bastante similares a las obtenidas para la trehalosa precipitada por CO₂ supercrítico. Al contrario, en el más bajo contenido de trehalosa (relaciones lisozima/trehalosa 1:2) los polvos mostraron solo la población de partículas de forma redonda. De este modo la lisozima se puede coprecipitar con trehalosa por CO₂ supercrítico para formar solo un tipo de partícula con el más bajo contenido de trehalosa (más altas relaciones proteína/trehalosa). Por consiguiente, existe un valor óptimo para la relación proteína/trehalosa que garantiza la mejor interacción entre los dos tipos de moléculas. Este comportamiento ha sido confirmado por análisis de DSC. La figura 7 muestra termogramas de DSC de varios polvos de lisozima coprecipitada. Como referencia, se muestran también lisozima y trehalosa puras precipitadas. Como se puede advertir, a más alto contenido de trehalosa (relación 1:5), las muestras contienen trehalosa amorfa que recupera el hábito cristalino (pico exotérmico a 197°C) y a continuación se funde a 214°C del mismo modo que la trehalosa misma precipitada. El comportamiento térmico de las muestras de más bajo contenido de trehalosa es bastante diferente. Las muestras con relaciones 1:2 a 4:1 muestran termogramas similares a los de la lisozima tal como está. La diferencia más relevante es la desviación hacia más bajas temperaturas de la transición característica de la lisozima a T=204°C. Cuanto más alto sea el contenido de trehalosa más baja es la temperatura de transición. De este modo, tenemos una fuerte evidencia de que la coprecipitación por medio de fluidos supercríticos permite una interacción íntima entre proteína y trehalosa. De hecho hasta una cantidad definida de azúcar (relación 1:2) obtenemos una fase sólida homogénea. Esta relación es capaz de proporcionar la mejor interacción proteína/azúcar y la mejor estabilidad a largo plazo de la proteína.

15

20

25

30

TABLA 1

Método de secado de la muestra	Relación ALP/trehalosa	Condiciones de almacenamiento	Actividad enzimática a 1 mes (% de t=0)	Actividad enzimática a 2 mes (% de t=0)	Actividad enzimática a 3 mes (% de t=0)	Actividad enzimática a 6 mes (% de t=0)
Liofilización de ALP Sigma	1:0	-20°C	-	-	-	96
		25°C/60% HR	101	100	101	95
		30°C/70% HR	103	103	94	86
		40°C/75% HR	94	85	75	42
ALP F6 SCF	1:0	-20°C	-	-	-	-
		25°C/60% HR	91	72	69	67
		30°C/70% HR	101	71	59	59
		40°C/75% HR	64	69	58	57
Liofilización de ALP F8	1:0	-20°C	-	-	-	-
		25°C/60°C HR	88	89	89	83
		30°C/70% HR	83	87	87	76
		40°C/75% HR	75	75	62	43
ALP FT8 SCF	1:10	-20°C	-	-	-	101
		25°C/60% HR	111	99	113	99
		30°C/70°C HR	104	97	102	99
		40°C/75% HR	113	98	101	99
Liofilización de ALP FT10	1:10	-20°C	-	-	-	95
		25°C/60% HR	95	95	93	90
		30°C/70% HR	94	96	92	88
		40°C/75% HR	94	93	92	90

TABLA 2

MUESTRA	Relación lisozima/trehalosa	Actividad enzimática (mg Enz. / mg Prot)	Contenido de proteína nominal (%)	No. de poblaciones de partículas	Tamaño de partícula (%<10 jím)
L3	1:0	0,96	102,6	1	99
LT2	1:10	1,04	104,3	2	-
LT3	1:1	0,96	100,8	1	98
LT6	1:5	0,96	104,0	2	92
LT8	4:1	1,01	103,2	1	97
LT9	1:2	0,98	104,0	1	93
LT10	2:1	0,97	103,9	1	97

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la coprecipitación de una proteína o polipéptido con un estabilizante para ellos, por medio de un procedimiento de gas antisolvente que comprende introducir en un recipiente de formación de partículas un fluido supercrítico mezclado con un modificador; y
- una disolución que comprende dicha proteína o polipéptido y dicho estabilizante disuelto en un disolvente; de modo que dicho disolvente se extrae de la disolución por medio de dicho fluido supercrítico y ocurre la coprecipitación de la sustancia y el estabilizante, en el que dicho estabilizante es trehalosa, dicho disolvente es agua, dicho fluido supercrítico es dióxido de carbono y dicho modificador se selecciona de metanol, etanol e isopropanol.
- 10 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la sustancia es una proteína.
3. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha disolución y dicho fluido supercrítico se introducen en dicho recipiente de formación de partículas vía boquillas de entrada separadas.
4. Un procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicho fluido supercrítico se introduce en dicho recipiente de formación de partículas vía una pluralidad de boquillas de entrada.
- 15 5. Un procedimiento según la reivindicación 4, en el que dichas boquillas están presentes en un disco, estando la boquilla de entrada de disolución en el centro de dicho disco rodeada por una pluralidad de boquillas de entrada de fluido supercrítico uniformemente distribuidas a lo largo de su circunferencia.
6. Un procedimiento según la reivindicación 1 a 5, en el que la disolución se introduce en el recipiente de formación de partículas mezclada con un modificador.
- 20 7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el modificador es etanol.
8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la relación de proteína o polipéptido a estabilizante en la disolución es 1:1 a 10 peso/peso.
9. Un procedimiento según la reivindicación 8, en el que la relación de proteína o polipéptido a estabilizante en la disolución es 1:2 peso/peso.
- 25 10. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el fluido supercrítico entra en el recipiente de formación de partículas a la velocidad del sonido en el fluido o mayor.
11. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que se usa un modificador y la relación entre el caudal de fluido supercrítico y el caudal de modificador está dentro del intervalo de 4:1 a 8:1 peso/peso.
- 30 12. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que se usa un modificador y la relación entre el caudal del modificador y el caudal de la disolución está dentro del intervalo de 15:1 a 25:1 peso/peso.

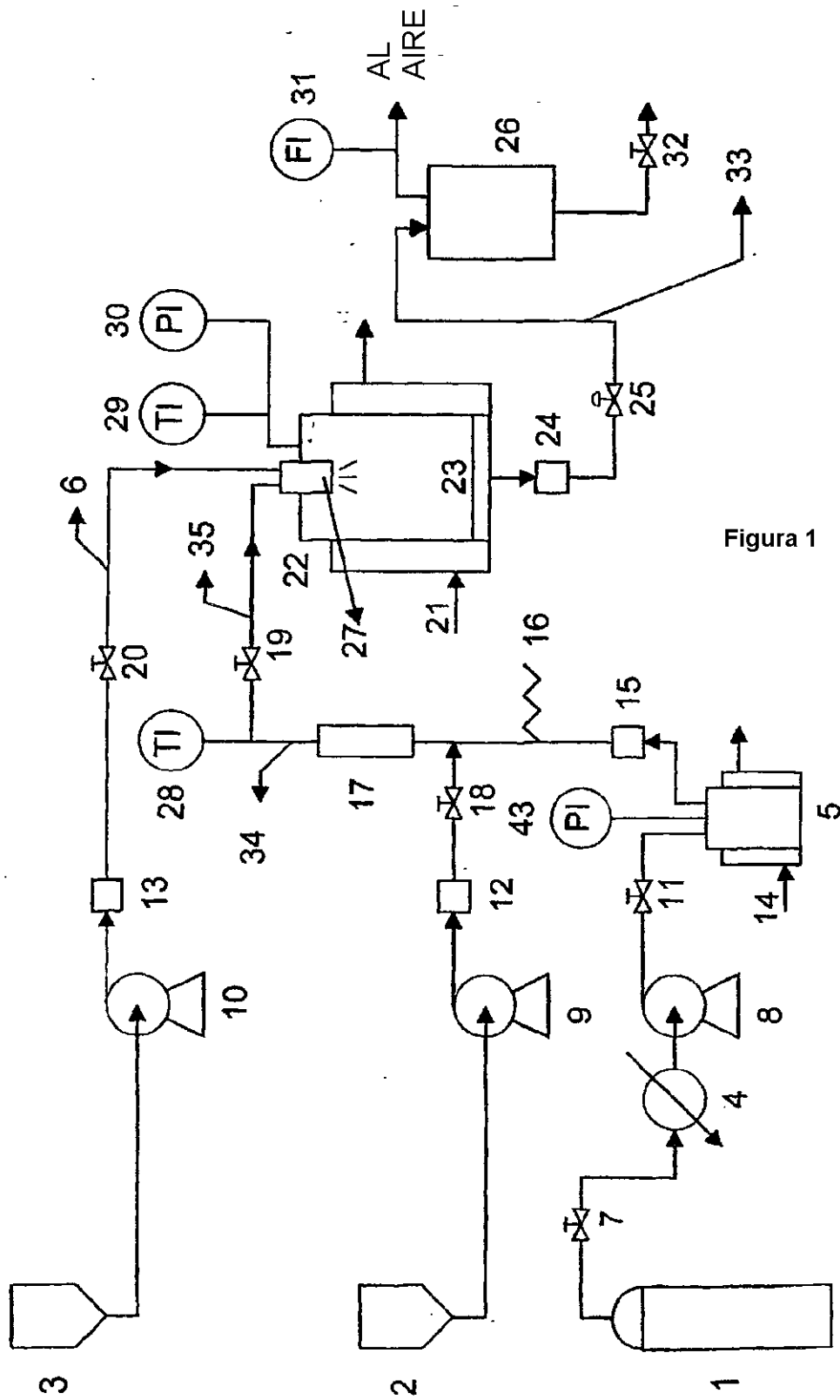


Figura 1

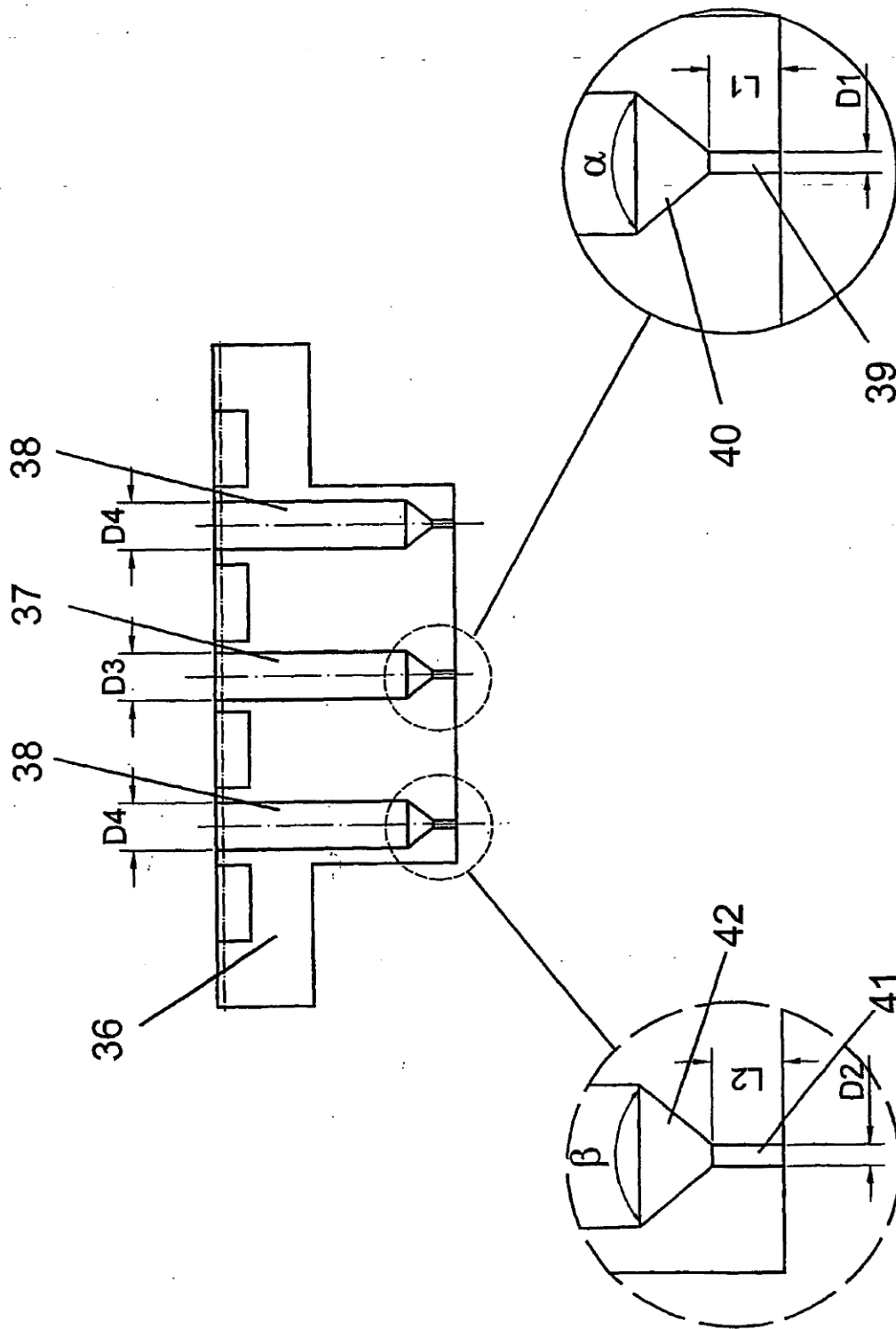


Fig. 2.

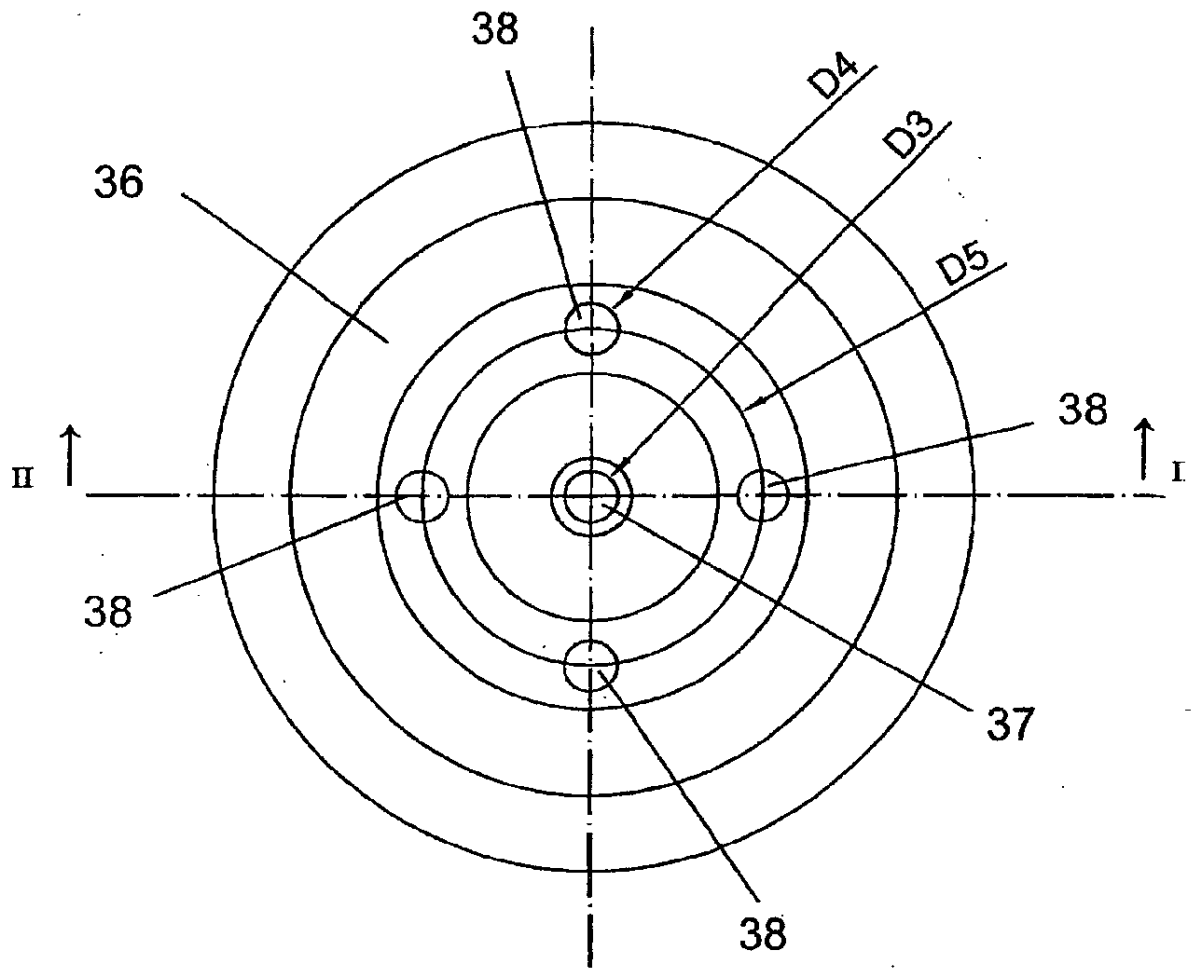


Figura 3

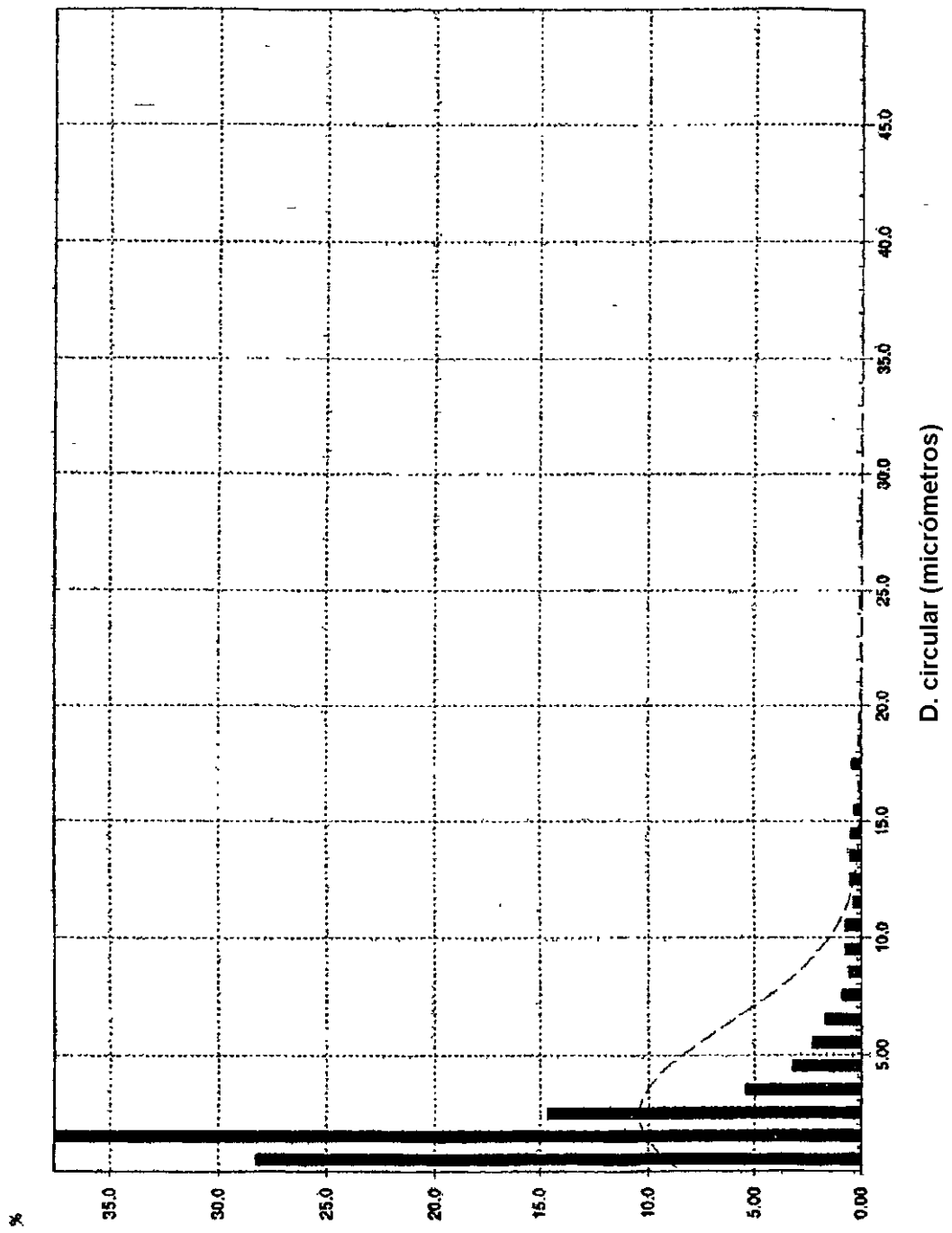


Figura 4

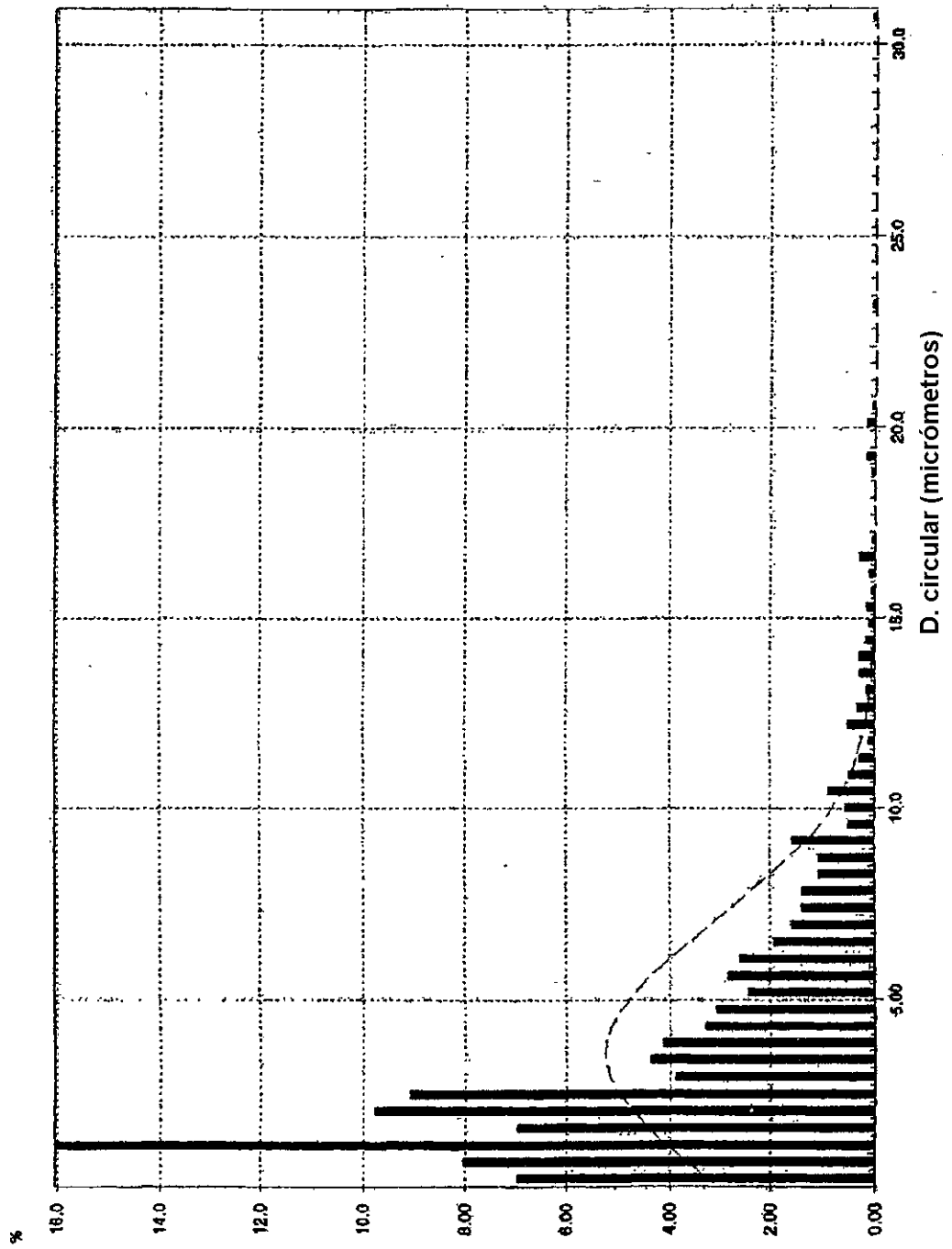


Figura 5

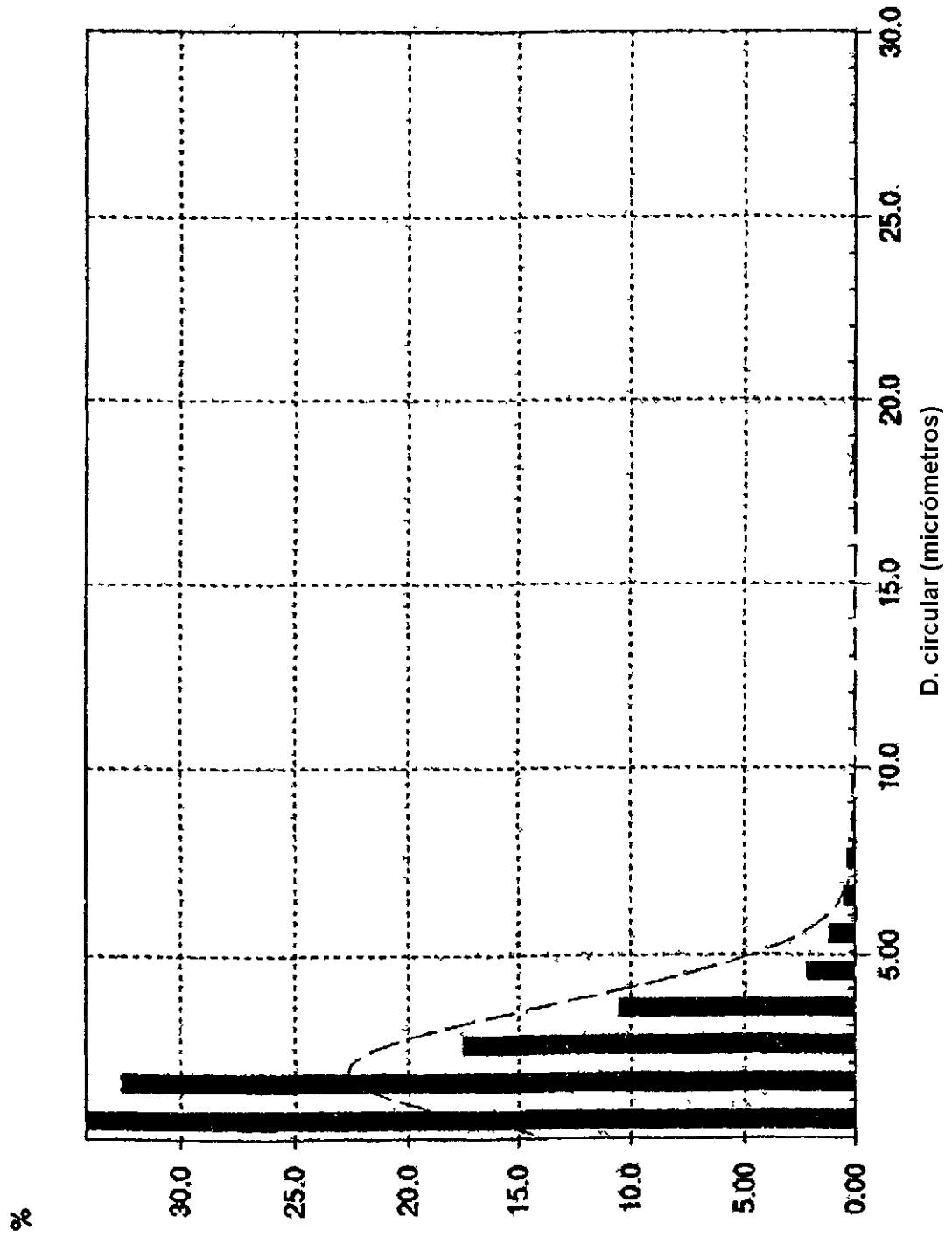


Figura 6

FIG. 7

Análisis térmico de polvos de lisozima/trehalosa coprecipitados con CO₂ supercrítico.
a: trehalosa pura; **b:** lisozima/trehalosa, relación 1:5; **c:** lisozima pura; **d:** lisozima/trehalosa, relación 4:1; **e:** lisozima/trehalosa, relación 2:1; **f:** lisozima/trehalosa, relación 1:2.

