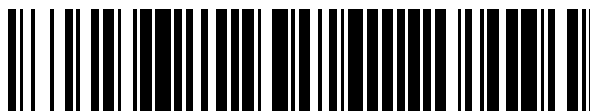


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 267**

51 Int. Cl.:
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 38/45 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04796096 .8**
96 Fecha de presentación: **22.10.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1675869**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.07.2006**

54 Título: **Composiciones estabilizadas**

30 Prioridad:
23.10.2003 US 514307 P
13.04.2004 US 561999 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.04.2012

73 Titular/es:
NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.
4560 HORTON STREET
EMERYVILLE, CA 94608, US;
CLAUDIA MAGAGNOLI y y
MAURIZIO MORANDI

72 Inventor/es:
MAGAGNOLI, Claudia y
MORANDI, Maurizio

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 379 267 T3

DESCRIPCIÓN

Composiciones estabilizadas.

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a la estabilización de una proteína de clase exotoxina que ribosila ADP bacteriana (bARE), un procedimiento para analizar una proteína de clase bARE, un procedimiento para la estabilización de la proteína bacteriana de clase bARE, composiciones que comprenden una proteína bARE estabilizada, composiciones que comprenden una proteína de clase bARE sustancialmente integral y formulaciones inmunogénicas que las incorporan.

Antecedentes

- 10 Una parte importante del desarrollo de un agente terapéutico proteico es la preparación de la proteína en una forma estabilizada que puede almacenarse durante periodos prolongados sin pérdida de actividad de modo que la dosis y actividad del agente terapéutico proteico pueda controlarse cuidadosamente.

- 15 Los polipéptidos pueden perder actividad biológica como resultado de inestabilidades físicas, incluyendo desnaturalización y formación de agregados solubles e insolubles, y una diversidad de inestabilidades químicas, tales como hidrólisis, oxidación y desamidación. La estabilidad de polipéptidos en formulaciones farmacéuticas líquidas puede verse afectada, por ejemplo, por factores tales como pH, fuerza iónica, temperatura, ciclos repetidos de congelación-descongelación, y exposición a fuerzas de cizallamiento mecánicas tales como las que se producen durante el procesamiento. La formación de agregados y pérdida de actividad biológica también puede producirse como resultado de agitación física e interacciones de moléculas polipeptídicas en solución y en las interfaces líquido-
20 aire dentro de frascos de almacenamiento. Pueden producirse cambios conformacionales adicionales en polipéptidos adsorbidos en las interfaces aire-líquido y sólido-líquido durante la compresión-extensión de las interfaces que resultan de agitación durante el transporte o de otro modo. Dicha agitación puede provocar que la proteína se enmarañe, agregue, forme partículas y en última instancia precipite con otras proteínas adsorbidas. Para una revisión general de estabilidad de agentes farmacéuticos proteicos, véase, por ejemplo, Manning y col. (1989) Pharm. Res. 6: 903-918, y Wang y Hanson (1988) J. Parenteral Sci. Tech. 42: S14.

- 25 El desarrollo de agentes terapéuticos proteicos multiméricos presenta desafíos adicionales especialmente si la integridad de la proteína multimérica es esencial para la eficacia del producto final terapéutico. En tales casos, no solamente es necesario asegurar que la proteína se mantenga sin pérdida de actividad y sin precipitación o agregación proteica sino que también es importante comprobar si la integridad de la proteína multimérica se ha
30 mantenido en el producto final terapéutico.

- Hasta la fecha, los trabajadores en el campo de la estabilización de proteínas multiméricas, tales como proteínas de clase exotoxina ribosilantes de ADP bacterianas (bARE, incluyendo toxina del cólera (véase documento US 2002/0044 939) y enterotoxina lábil por calor de *E. coli* (véase Pronk y col., J. Biol. Chem. 260: 13508-4) que se
35 organizan como multímeros A:B se han enfrentado con al menos dos tipos de problemas diferentes cuando trabajan con tales proteínas. En particular, las proteínas bARE pueden perder su actividad biológica: (i) como resultado de inestabilidades físicas incluyendo desnaturalización y formación de agregados solubles e insolubles; y/o (ii) por la disociación parcial o completa de la proteína bARE en sus formas subunitarias A y B.

- En ocasiones puede ser fácil ver cuando una proteína, tal como una proteína multimérica precipita en una solución debido a que pueden formarse partículas cristalinas o agregados. Por otro lado, no es tan fácil determinar si una
40 proteína multimérica se ha disociado parcial o completamente en sus formas subunitarias porque, por ejemplo, un ensayo proteico, no diferenciará entre formas intactas y disociadas de la proteína multimérica.

- Hasta la fecha, no ha estado disponible información sobre como medir la integridad de multímeros proteicos de bARE sin pérdida de la estructura multimérica integral. Los métodos analíticos actuales usados para caracterizar proteínas de clase bARE multiméricas, incluyendo electroforesis, inmunotransferencia, espectrometría de masas y
45 análisis de aminoácidos, son incapaces de distinguir entre la estructura multimérica integral y las formas subunitarias disociadas separadas. Esta incapacidad de diferenciar entre proteínas bARE integrales y disociadas se debe al hecho de que las técnicas analíticas actuales requieren la disociación de las formas subunitarias A y B y por lo tanto no mantienen la organización estructural de la molécula bARE multimérica integral. Tampoco permiten estas técnicas la cuantificación de la molécula bARE integral en relación con la molécula subunitaria disociada. Por lo
50 tanto, los procedimientos analíticos actuales no son útiles para estudiar la disociación (o pérdida de integridad) de la proteína bARE multimérica a lo largo del tiempo ni para buscar modos de estabilizar la proteína bARE multimérica. Además, incluso cuando se usan procedimientos de separación tradicionales, tales como procedimientos de filtración en gel, que no requieren la disociación en forma subunitarias monoméricas, estos procedimientos no son
55 muy eficaces puesto que no permiten una buena resolución de las diferentes formas subunitarias debido a tiempos de retención extremadamente cercanos.

Como resultado, hasta la fecha, no ha estado disponible un procedimiento fiable para determinar si una muestra particular de una molécula bARE está presente o no en una forma intacta o disociada para los trabajadores en el

campo de las moléculas bARE. Un procedimiento tal no sería útil solamente para: (i) distinguir entre la estructura bARE multimérica integral y subunidades A y B disociadas, separadas sino que también sería útil para (ii) investigar y determinar las condiciones requeridas para la estabilidad de una proteína de clase bARE incluyendo la identificación de agentes estabilizadores eficaces. Los procedimientos para evaluar, conseguir y cuantificar la estabilidad de proteínas de clase bARE serían muy útiles para (iii) el desarrollo de formulaciones apropiadas para proteínas de clase bARE para almacenamiento estable y suministro de la proteína bARE, sola o, por ejemplo, como parte de una composición, tal como una composición inmunogénica (por ejemplo, vacuna).

Como se ha mencionado anteriormente, otro obstáculo principal que debe superarse en el uso de agentes farmacéuticos basados en proteínas, tales como los que incluyen una proteína bARE como un agente terapéutico es la pérdida de utilidad farmacéutica que puede resultar de su inestabilidad en formulaciones farmacéuticas. La estabilización de polipéptidos en composiciones farmacéuticas sigue siendo un área en el que la prueba y error desempeña un papel principal (revisado por Wang (1999) Int. J. Pharm. 185: 129-188; Wang y Hanson (1988) J. Parenteral Sci. Tech. 42: S3-S26). Los excipientes que se añaden a formulaciones farmacéuticas polipeptídicas para aumentar su estabilidad incluyen tampones, azúcares, tensioactivos, aminoácidos, polietilenglicoles y polímeros, pero los efectos estabilizadores de estos aditivos químicos pueden variar dependiendo de la proteína. Las inestabilidades físicas que amenazan la actividad y eficacia polipeptídica en formulaciones farmacéuticas incluyen desnaturalización y formación de agregados solubles e insolubles. Se sabe que algunos de estos cambios conducen a la pérdida o reducción de la actividad farmacéutica de la proteína bARE de interés. En otros casos, los efectos precisos de estos cambios se desconocen, pero los productos degradantes resultantes aún se consideran farmacéuticamente inaceptables debido al potencial de efectos secundarios indeseables.

La formación de agregados por un polipéptido tal como una molécula bARE durante el almacenamiento de una composición farmacéutica puede afectar de forma adversa a la actividad biológica de ese polipéptido, dando como resultado pérdida o reducción de la actividad farmacéutica o eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede provocar otros problemas tales como bloqueo de los tubos, membranas o bombas cuando la estabilidad funcional de una proteína bARE se determina usando un sistema analítico, tal como un procedimiento cromatográfico o cuando la composición farmacéutica basada en proteína bARE se administra usando un sistema de infusión. Además, la inyección de una composición farmacéutica que comprende la forma agregada de una proteína tiene el potencial de generar una reacción inmunogénica a la proteína agregada.

En consecuencia, también existe la necesidad de: (i) encontrar formas de determinar la estabilidad de una proteína bARE a lo largo del tiempo; (ii) identificar estabilizadores que puedan mejorar la estabilidad de una proteína bARE a lo largo del tiempo; y (iii) proporcionar composiciones bARE que sean estables en almacenamiento y que tengan una actividad prolongada a lo largo del tiempo.

Sumario

La presente invención proporciona composiciones que comprenden una proteína bARE estabilizada en la clase ABS. La composición incluye arginina y un derivado de colesterol con un ácido carboxílico.

Breve descripción de los dibujos

La siguiente invención se describirá ahora adicionalmente solamente como ejemplo en el que se hace referencia a las siguientes figuras. Los siguientes ejemplos se presentan solamente para ilustrar la presente invención y para ayudar a un experto en la materia en la preparación y uso de la misma. Los ejemplos no pretenden de ningún modo limitar de otra manera el alcance de la invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero debería tenerse en cuenta, por supuesto, cierto error experimental y desviación.

Las Figuras 1A-B representan los cromatogramas de muestras de LTK63 (proteína AB₅) procesadas en un sistema GF-HPLC convencional inmediatamente después de la preparación de muestras y cinco días después de la preparación de muestras.

La Figura 1C representa el cromatograma de las muestras de LTK63 procesadas en un sistema GF-HPLC de acuerdo con la presente invención cinco días después de la preparación de muestras.

La Figura 1D compara valores de Área y % de Área obtenidos para la misma muestra de LTK63 cuando se procesa en las 2 columnas diferentes, que son análisis de GF-HPLC "antiguo" en TSK G3000SWxl y análisis de GF-HPLC "Nuevo" en Ultrahydrogel 250 en las mismas condiciones analíticas.

Las Figuras 2A-D representan cromatogramas que ilustran el efecto de fuerza iónica en la selectividad de formas AB₅ y B₅ en un sistema cromatográfico de acuerdo con la presente invención.

La Figura 3 ilustra el perfil cromatográfico de una muestra de LTK63 parcialmente disociada en un sistema cromatográfico de acuerdo con la presente invención usando el siguiente tampón de elución: KPi 200 mM + Na₂SO₄ 100 mM; pH 7,2.

La Figura 4 ilustra el cromatograma de una muestra de LTK63 parcialmente disociada en un sistema cromatográfico de acuerdo con la presente invención. En particular, la figura 4 presenta un cromatograma de 214 nm de un procesamiento de fraccionamiento sencillo.

Las Figuras 5A y 5B, respectivamente, muestran los cromatogramas y autorradiografías de SDS-PAGE de

fracciones de la muestra de LTK63 cuya separación se muestra en la Figura 4 para verificar la atribución de picos obtenidos en las separaciones de GF-HPLC a las formas AB₅ y B₅ de la proteína;

Las Figuras 5C y 5D proporcionan una curva de calibración de la columna de Ultrahydrogel que se preparó con proteínas convencionales de PM conocido. La R² correspondiente fue de 0,95. La Figura 5C muestra una superimposición de proteínas convencionales, referencia CRM197, LTK63 y curva de calibración usados para determinación de PM aparente.

La Figura 5E proporciona una representación de Debye en relación con análisis de dispersión de la Luz (DL) del pico AB₅. La ordenada en el origen proporciona el PM mientras que la pendiente inicial proporciona el valor del radio para cada corte.

La Figura 5F(a) y la Figura 5F(b) muestran un análisis de LTK63 nativa y tres muestras obtenidas por fraccionamiento de GF-HPLC en CL-ESI-EM para confirmar la atribución de picos.

La Figura 5G muestra un espectro de EM de pico 1.

La Figura 6 muestra análisis de SDS-PAGE de muestras de LTK63 agitadas. Las muestras aplicadas a cada carril son como sigue: **1** LTK63 en PBS T0; **2** LTK63 en Sobrenadante de PBS T1; **3** LTK63 en Sobrenadante de PBS T6; **4** PM; **5** LTK63 en Sobrenadante de NaCl 0,5 M T0; **6** LTK63 en Sobrenadante de NaCl 0,5 M T1; **7** LTK63 en Sobrenadante de NaCl 0,5 M T6; **8** LTK63 en fosfato 20 mM, CHAPS 0,25 % T0; **9** LTK63 en fosfato 20 mM, Sobrenadante de CHAPS 0,25 % T1; **10** LTK63 en fosfato 20 mM, Sobrenadante de CHAPS 0,25 % T6; y **11** patrón de LTK 63.

La Figura 7 muestra análisis de SDS-PAGE de muestras de LTK63 tratadas con CHAPS a diversas concentraciones. Las muestras aplicadas a cada carril son como sigue: **1** marcador de Calibración de PM; **2** LTK63 en fosfato 20 mM, sobrenadante de CHAPS 0,1 % T3; **3** LTK63 en fosfato 20 mM, sedimento de CHAPS 0,1 % T3; **4** LTK63 en fosfato 20 mM, sobrenadante de CHAPS 0,25 % T3; **5** LTK63 en fosfato 20 mM, sedimento de CHAPS 0,25 % T3; **6** LTK63 en fosfato 20 mM, sobrenadante de CHAPS 0,5 % T3; **7** LTK63 en fosfato 20 mM, sedimento de CHAPS 0,5 % T3.

La Figura 8 muestra un análisis de SDS-PAGE de muestras de LTK63 tratadas con L-Arginina 100 mM. Las muestras aplicadas a cada carril fueron como sigue: **1** PM; **2** LTK63 2 mg/ml en fosfato 20 mM, sobrenadante de L-Arginina 100 mM T1; **3** LTK63 2 mg/ml en fosfato 20mM, sedimento de L-Arginina 100 mM T1; **4** LTK63 4 mg/ml en fosfato 20 mM, sobrenadante de L-Arginina 100 mM T1 LTK63 4 mg/ml en fosfato 20 mM, sedimento de L-Arginina 100 mM T1.

La Figura 9(a) muestra un análisis de muestras de LTK63 agitadas con L-Arginina usando un procedimiento de HPLC antiguo conocido.

La Figura 9(b) muestra un análisis de muestras de LTK63 agitadas con L-Arginina usando el nuevo procedimiento de HPLC.

La Figura 10(a) proporciona una determinación de disociación de AB₅ en muestras tratadas con L-Arginina y el % de B₅ en LTK63 a 1,3 mg/ml usando el nuevo Procedimiento de HPLC.

La Figura 10(b) proporciona una determinación de disociación de AB₅ en muestras tratadas con L-Arginina y el % de B₅ en LTK63 a 4,0 mg/ml usando el nuevo Procedimiento de HPLC.

La Figura 11(a) muestra el efecto de la inclusión de CHAPS en disociación de LTK63.

La Figura 11(b) muestra el efecto de la inclusión de CHAPS en combinación con L-Arginina en la disociación de LTK63.

La Figura 12 muestra el efecto de L-Arginina y CHAPS en la estabilidad de LTK63 a una concentración proteica de 1,3 mg/ml.

La Figura 13 muestra el efecto de L-Arginina y la combinación de L-Arginina/CHAPS en la estabilidad de LTK63 a una concentración proteica de 4,0 mg/ml.

La Figura 14 muestra el efecto de condiciones de almacenamiento en la estabilidad de LTK63 en tampones que contienen L-Arginina + CHAPS.

La Figura 15 proporciona una comparación de estabilidad de LTK 63 en tampones de almacenamiento de L-Arginina + CHAPS y L-Arginina.

La Figura 16 proporciona la estructura de detergentes zwitteriónicos tales como CHAPS y CHAPSO.

La Figura 17 proporciona información sobre varios detergentes zwitteriónicos.

Los símbolos de aminoácidos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB se proporcionan a continuación junto con los códigos de tres letras que también se proporcionan para fines de referencia.

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido Aspártico
E	Glu	Ácido Glutámico
F	Fe	Fenilalanina

G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina

Descripción detallada

Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que la presente invención no se limita a moléculas o parámetros de procedimiento particularmente ejemplificados puesto que tales pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir realizaciones particulares de la invención solamente, y no se pretende que sea limitante. Además, la práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique de otro modo, procedimientos convencionales de virología, microbiología, biología molecular, técnicas de ADN recombinante e inmunología todas las cuales están dentro de la experiencia habitual de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Edición, 1989); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); y *Fundamental Virology*, 2ª Edición, vol. I & II (B. N. Fields y D. M. Knipe, eds.).

Debe observarse que, como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un” y “el” incluyen referencias plurales a no ser que el contenido claramente indique otra cosa. Todos los términos científicos y técnicos usados en la presente solicitud tienen significados habitualmente usados en la técnica a no ser que se especifiquen de otro modo. Como se usa en la presente solicitud, las siguientes palabras o frases tienen los significados especificados.

El término “comprender” significa “incluir” así como “consistir” por ejemplo una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

El término “aproximadamente” en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

A no ser que se indique de otro modo, la terminología usada en el presente documento debería tomar su significado normal como se entiende por un experto en la materia. Para facilitar el entendimiento de la presente invención, se usan varios términos definidos en el presente documento para designar elementos particulares de la presente invención. Cuando se usan de este modo, se pretenden los siguientes significados:

Exotoxinas que ribosilan ADP bacterianas (bARE)

Como se usa en el presente documento, el término “bARE” se refiere a una clase de toxinas bacterianas que ribosilan ADP que son una familia de exotoxinas bacterianas relacionadas e incluyen toxina diftérica (DT), toxina pertussis (PT), toxina del cólera (CT), las toxinas lábiles por calor de *E. coli* (LT1 y LT2), endotoxina A de *Pseudomonas*, exotoxina S de *Pseudomonas*, exoenzima de *B. cereus*, toxina de *B. sphaericus*, toxinas C2 y C3 de *C. botulinum*, exoenzima de *C. limosum*, así como toxinas de *C. perfringens*, *C. spiriformis* y *C. difficile*, EDIN de *Staphylococcus aureus* y mutantes de toxinas bacterianas que ribosilan ADP tales como CRM₁₉₇, un mutante de toxina diftérica no tóxica (véase, por ejemplo, Bixler y col. (1989) *Adv. Exp. Med. Biol.* 251: 175; y Constantino y col. (1992) *Vaccine*). La mayoría de las toxinas bacterianas de ribosilación de ADP se organizan como un multímero A:B, en el que la subunidad A contiene la actividad enzimática tóxica llamada actividad ADP ribosiltransferasa, y la subunidad B actúa como el resto de unión. Las toxinas catalizan la transferencia de una unidad de ADP-ribosa de NAD⁺ a una proteína diana.

Como se usa en el presente documento, el término “estabilizado” se refiere a la estabilización física y/o la estabilización funcional de la proteína bARE. El término “estabilizado” también se refiere a estabilidad de almacenamiento a lo largo del tiempo, que es el mantenimiento de la estabilidad física y/o la estabilidad funcional a lo largo del tiempo.

- 5 Como se usa en el presente documento, la expresión “estabilizar físicamente” o “estabilización física” se usa de forma sinónima con inhibir, reducir, suprimir, descender, disminuir, minimizar o bajar la precipitación o cristalización, o agregación o formación de agregados y posible rotura de la proteína bARE. Las expresiones precipitación o cristalización, o agregación o formación de agregados se usan de forma intercambiable a lo largo de la memoria descriptiva. Una proteína bARE puede estabilizarse usando agentes estabilizadores que minimizan sustancialmente la agregación o formación de agregados de moléculas biológicas bARE. La minimización sustancial de agregación o formación de agregados se refiere a una reducción de agregación o formación de agregados de aproximadamente 25 % a aproximadamente 100 % en comparación con los controles que no incluyen los agentes estabilizadores. Preferentemente, la agregación o rotura se inhibe en aproximadamente 50 %, más preferentemente en aproximadamente 75 % e incluso más preferentemente en aproximadamente 100 %.
- 10 Por “agregado” o “formación de agregados” se entiende una interacción física entre las moléculas polipeptídicas que puede dar como resultado la formación de oligómeros u otras formas ordenadas mayores que pueden permanecer solubles o que pueden precipitar o cristalizar en la solución. Como se usa en el presente documento, el término “oligómero” significa una molécula que comprende una pluralidad de unidades bARE multiméricas, tales como de aproximadamente dos a aproximadamente cinco unidades bARE multiméricas.
- 15 Están disponibles en la técnica procedimientos para controlar la estabilidad física de las composiciones bARE de la presente invención, incluyendo los procedimientos descritos en los ejemplos desvelados en el presente documento. Por lo tanto, la formación de agregados de bARE, tal como formación de agregados de AB₅ durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida de la invención puede determinarse fácilmente midiendo el cambio de proteína bARE soluble en solución a lo largo del tiempo. La cantidad de polipéptido precipitado en solución puede determinarse cualitativamente por inspección visual o determinarse cuantitativamente por varios ensayos analíticos adaptados para detección de una proteína bARE precipitada. Tales ensayos para medición cuantitativa incluyen, por ejemplo, espectroscopia de absorción de UV y (RP)-HPLC de fase inversa. Aunque los experimentos de solubilidad pueden determinar cuanta de una proteína bARE está en solución, pueden requerirse otras técnicas para determinar el estado de agregación de la proteína. Puede ser importante determinar si una proteína está en su estructura nativa en una formulación dada y determinar cuanta de la proteína (si hay alguna) existe en formas ordenadas mayores tales como formas agregadas. La ultracentrifugación analítica es una de las técnicas más potentes para dilucidar el estado de agregación de las proteínas (véase Liu y Shire (1999) J. Pharm. Sci. 88: 1237-1241). La determinación de agregados tanto solubles como insolubles durante almacenamiento en formulaciones líquidas puede conseguirse, por ejemplo, usando ultracentrifugación analítica para distinguir entre la parte del polipéptido soluble que está presente como agregados solubles y la parte que está presente en forma molecular biológicamente activa no agregada.
- 20 25 30 35

- La expresión “estabilización funcional” se refiere a la existencia y/o mantenimiento de una forma sustancialmente integral de una proteína bARE que es importante para la funcionalidad de la proteína bARE. Como se usa en el presente documento, la expresión “estabilizar funcionalmente” o “estabilización funcional” se usa de forma sinónima con los términos inhibir, reducir, suprimir, descender, disminuir, bajar o minimizar la disociación de las moléculas proteicas bARE. La presente invención se refiere a procedimientos para estabilizar una proteína bARE usando agentes que sustancialmente minimizan la disociación de moléculas biológicas bARE. La minimización sustancial de disociación se refiere a una reducción de disociación de aproximadamente 25 % a aproximadamente 100 % en comparación con controles que no incluyen el agente de estabilización. Preferentemente, la disociación se inhibe en aproximadamente 50 %, más preferentemente en aproximadamente 75 %, e incluso más preferentemente en aproximadamente 100 %.
- 40 45

Como se usa en el presente documento, la expresión “sustancialmente integral” se refiere a una estructura intacta, nativa, no disociada o conformación de una proteína de clase bARE.

- La estabilidad funcional de una muestra de proteína bARE puede determinarse analizando la muestra bARE usando el procedimiento analítico de la presente invención y calculando el grado de integridad de la proteína bARE usando una relación de integridad para la muestra bARE.
- 50

- De acuerdo con principios bien conocidos, las áreas relativas de los picos que representan la proteína AB₅ y subunidad proteica B₅ en el cromatograma representan las proporciones relativas de las formas AB₅ y B₅ en la muestra. Las proporciones relativas de las formas AB₅ y B₅ en la muestra pueden usarse para determinar la estabilidad funcional de la muestra.
- 55

La expresión “Relación de Integridad” se usa en el presente documento para referirse a una relación de proteína bARE integral con sus formas subunitarias A y B disociadas en una muestra como se determina por el porcentaje de área bajo los picos obtenido para las formas no disociadas y disociadas de la proteína bARE usando el procedimiento analítico de la presente invención. Es decir, la relación de proteína bARE intacta completamente

asociada frente a formas subunitarias pentaméricas A y B₅ parcialmente disociadas y formas B monoméricas completamente disociadas. La expresión “relación de integridad” se usa en relación con una determinación de la estabilidad funcional de una proteína de clase bARE de acuerdo con un procedimiento analítico de la presente invención. Una proteína de clase bARE, tal como una proteína AB₅, se considera funcionalmente estable o funcionalmente estabilizada si tiene una relación de integridad de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 2:1 o de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 3,5:1 o de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 4,5:1. Debería entenderse que en un caso en el que la cantidad de subunidad disociada B₅ en la muestra es tan pequeña (por ejemplo, menor de aproximadamente 3 %), como para no ser detectable usando el procedimiento analítico de la presente invención, la relación de integridad puede no ser una medida significativa, pero la proteína bARE puede aún considerarse funcionalmente estable.

La proteína bARE es una proteína AB₅.

Proteínas AB₅

Las exotoxinas que ribosilan ADP bacterianas (bARE) preferidas para su uso en las composiciones de la presente invención incluyen toxina del cólera (CT) y la toxina lábil por calor de *E. coli* (LT). Las exotoxinas CT y LT son hexámeros, compuestos de una molécula sencilla de una subunidad A rodeada por un anillo en forma de rosquilla compuestos de 5 moléculas de la subunidad B. La toxina lábil por calor (LT) de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) es estructuralmente, funcionalmente e inmunológicamente similar a CT y las dos toxinas reaccionan de forma cruzada inmunológicamente. Convencionalmente, las proteínas CT y LT se denominan proteínas AB₅. La proteína nativa completa se indica como AB₅, las subunidades parcialmente disociadas como forma pentamérica B₅ y A consistente en cinco subunidades idénticas y el monómero sencillo de la subunidad B designado como Bm.

CT es la enterotoxina bacteriana prototipo. Es una proteína construida a partir de dos tipos de subunidades: una subunidad A sencilla de peso molecular 28.000 y cinco subunidades B, cada una con un peso molecular de 11.600 que proporciona una holotoxina con un peso molecular de aproximadamente 84.000. Las subunidades B se agregan en un anillo por enlaces no covalentes estrechos; la subunidad A está ligada a y probablemente parcialmente insertada en el anillo de pentámero B a través de interacciones no covalentes más débiles. Los dos tipos de subunidades tienen diferentes papeles en el procedimiento de intoxicación: las subunidades B son responsables de unión celular y la subunidad A de la actividad tóxica directa. La subunidad A contiene dos dominios. El dominio A1 posee actividad de ribosilación de ADP, que es responsable de la toxicidad de la subunidad A. El dominio A2 interacciona con el oligómero B. La actividad enzimática requiere la escisión proteolítica del bucle entre los dos dominios y la reducción del enlace disulfuro entre A1-cys187 y A2-cys199. La subunidad tóxica A induce los cambios enzimáticos (debido a su actividad de ribosilación de ADP) que conducen a secreción de fluidos y diarrea mientras que la subunidad B no tóxica es el resto inmunogénico que se une al receptor de gangliósido GM-1 para la toxina en células epiteliales intestinales (Holmgren J Nature (1981) 292; 413).

LT es una enterotoxina lábil por calor de *Escherichia coli* de tipo I. Consiste en (i) una subunidad A compuesta de una cadena polipeptídica sencilla de 240 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 27 kDa, que contiene la actividad de ribosilación de ADP tóxica y (ii) un complejo de B₅ en forma de anillo pentamérico formado por cinco monómeros idénticos de 103 aminoácidos cada uno con un peso molecular de aproximadamente 58,5 kDa que contienen los sitios de unión a gangliósido. El lado interno del poro de B₅ está compuesto de aminoácidos cargados que interaccionan con el dominio A2 de la subunidad A, correspondiente a los aminoácidos 193-240. El resto de la subunidad A, dominio A1, conserva la actividad catalítica. Las subunidades tanto A como B contienen un alto porcentaje de aminoácidos cargados positivamente (subunidad A, IP = 6,3, Subunidad B, IP = 8,87 y AB₅, IP = 8,5).

En ciertas realizaciones preferidas, la exotoxina que ribosila ADP bacteriana (bARE) es una toxina del cólera (CT) o una proteína AB₅ de enterotoxina lábil por calor de *E. coli* (LT).

En realizaciones particularmente preferidas, las secuencias codificantes de subunidad peptídica de exotoxina que ribosila ADP se obtienen o derivan de una toxina del cólera (CT). En otras realizaciones particularmente preferidas, las secuencias codificantes de péptido de subunidad de exotoxina que ribosila ADP se obtienen o derivan de una enterotoxina lábil por calor de *E. coli* (LT), por ejemplo proteínas A₅ de LT1 o LT2.

Separación de formas AB₅ y B₅ de una Proteína de Clase AB₅

Se ha descubierto ahora inesperadamente que pueden separarse proteínas de clase bARE, tales como la molécula AB₅ intacta nativa y las formas B₅ parcialmente disociadas de la proteína de clase AB₅ en condiciones no disociativas que diferencian entre proteínas de clase bARE integrales y disociadas. Generalmente, un material adecuado para separar una molécula bARE intacta, nativa, tal como una molécula AB₅ y sus formas subunitarias disociadas, es un material de separación de polímeros cargados por el que las diferentes formas de la molécula bARE aplicada al material de separación puede separarse con un tampón iónico. Preferentemente, el material de separación de columna de polímero cargado es un material de separación de hidrogel.

Las composiciones de hidrogel se conocen bien en la técnica biomédica, y se usan habitualmente como sustratos para cultivo celular y tisular, materiales de impresión para prótesis, materiales de relleno de heridas, o como

materiales en fase sólida en aplicaciones de cromatografía de afinidad o exclusión de tamaño. Por ejemplo, se han usado composiciones de hidrogel de agarosa no porosos, deformados y/o derivatizados en procedimientos de cromatografía líquida de alto rendimiento y cromatografía de afinidad (Li y col (1990) *Preparative Biochem.* 20: 107-121), y se han usado perlas de hidrogel de agarosa superporosas como un soporte en cromatografía de interacción hidrófoba (Gustavsson y col (1999) *J. Chromatography* 830: 275-284).

Los hidrogeles útiles en la presente invención pueden ser de origen natural (por ejemplo, agarosa y alginato) o pueden prepararse o modificarse de forma sintética. Un hidrogel es un material que comprende una red tridimensional macromolecular que permite que se hinche cuando está en presencia de agua, que se encoja en ausencia de (o por reducción de la cantidad de) agua pero que no se disuelve en agua. El hinchamiento, es decir, la absorción de agua, es una consecuencia de la presencia de grupos hidrófilos funcionales unidos a o dispersados en la red macromolecular. Reticulaciones entre macromoléculas adyacentes dan como resultado insolubilidad acuosa de estos hidrogeles. Las reticulaciones pueden deberse a enlaces químicos (es decir covalentes) o físicos (es decir, fuerzas de Van Der Waal, enlaces de hidrógeno, fuerzas iónicas, etc.). Una característica de un hidrogel que es de particular valor es que el material conserva la forma general, deshidratada o hidratada. Por lo tanto, si el hidrogel tiene una forma aproximadamente esférica en la condición deshidratada, será esférica en la condición hidratada.

Generalmente se preparan hidrogeles preparados de forma sintética polimerizando un material monomérico para formar una cadena principal y reticular la cadena principal con un agente de reticulación. Los monómeros de hidrogel habituales incluyen pero sin limitación los siguientes: ácido láctico, ácido glicólico, ácido acrílico, 1-hidroxietil metacrilato (HEMA), etil metacrilato (EMA), propilenglicol metacrilato (PEMA), acrilamida (AAM), N-vinilpirrolidona, metil metacrilato (MMA), glicidil metacrilato (GDMA), glicol metacrilato (GMA), etilenglicol, ácido fumárico y similares. Los agentes de reticulación habituales incluyen tetraetilenglicol dimetacrilato (TEGDMA) y N,N'-metilenbisacrilamida.

Algunos hidrogeles sintéticos se preparan por polimerización de radicales libres de monómeros de vinilo hidrófilo. La etapa de inicio es la formación de un radical libre, habitualmente mediante la adición de iniciadores de tipo azo tales como 2,2'-azobis(2-metilpropanonitrilo) o iniciadores de peróxido tales como peróxido de benzoilo. La radiación gamma o de luz ultravioleta también puede iniciar la reacción. La propagación tiene lugar por reacción de radicales libres con los grupos de monómero de vinilo. Normalmente una parte de la mezcla de reacción consiste en compuestos de vinilo difuncionales que proporcionan un grado de reticulación. La hidrofilia del gel habitualmente se controla por copolimerización de un monómero de vinilo hidrófilo e hidrófobo en el gel. La permeabilidad de un hidrogel se determina, entre otros, por el alcance de la reticulación, el grado de hidratación del gel y la naturaleza del permeante.

Preferentemente el material de separación es un material de polimetacrilato hidroxilado (HEMA).

La cantidad y tipo de disolvente usado en la mezcla de polimerización puede afectar sustancialmente a la calidad del gel producido. Por ejemplo, el poli(hidroxietil metacrilato), o poli(HEMA), 35-40 % en peso de agua, y por lo tanto poli(HEMA) preparado a partir de mezclas de reacción de polimerización que contienen una mayor cantidad de agua contiene huecos llenos de agua y son de apariencia translúcida u opaca. La reticulación habitualmente reduce la sorción de agua del polímero.

Puede encontrarse análisis adicional de hidrogeles sintéticos en "Controlled Release of Biologically Active Agents" por Richard Baker, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, pp. 101-104 y 178-183 y en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 20020061336. El material de separación de polímeros puede tener un tamaño de partícula de aproximadamente cuatro a aproximadamente diez micrómetros y porosidad desde aproximadamente 250 Å. Preferentemente el tamaño de partícula es de aproximadamente 6 micrómetros. El tamaño de poro puede depender del tamaño de la molécula bARE que se analiza. El tampón es de fuerza iónica adecuada y el sistema de tampón es capaz de mantener el pH del tampón de elución dentro del intervalo de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0. Preferentemente, el pH del tampón de elución está en el intervalo de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5. Más preferentemente, el pH del tampón de elución está en el intervalo de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,2.

En una realización preferida específica, la columna de cromatografía líquida de alto rendimiento-filtración en gel comprende material de separación de polimetacrilato hidroxilado que tiene grupos carboxilo residuales, por ejemplo, una columna de exclusión por tamaño Waters Ultrahydrogel 250, disponible de Waters, Milford, MA. La Ultrahydrogel 250 tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 6 micrómetros y una porosidad de aproximadamente 250 Å. El tampón iónico es de fuerza iónica, composición y pH adecuados, por ejemplo, de aproximadamente 100-400 mM de un tampón fosfato/sulfato sustancialmente neutro. Por ejemplo, en una realización preferida, el tampón puede ser, por ejemplo, fosfato potásico (KPi) y Na₂SO₄, en particular KPi 200 mM y Na₂SO₄ 100 mM, pH 7,2. En una realización preferida, el tampón de elución comprende agentes estabilizadores compatibles con la molécula bARE que se analiza.

Para el sistema Ultrahydrogel 250/KPi 200 mM y Na₂SO₄ 100 mM, pH 7,2, las dimensiones de columna son diámetro interior 7,8 mm x longitud 300 mm. Un caudal de elución adecuado es de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,7 ml/min, preferentemente, por ejemplo, aproximadamente 0,5 ml/minuto. La detección puede realizarse con un detector de serie de fotodiodos (PDA) que funciona a 214 y 280 nm. El tiempo de procesamiento

cromatográfico generalmente no es más de 30 minutos.

Usando un sistema cromatográfico tal, es posible obtener buena separación de picos entre las formas AB₅ y B₅ de una proteína de clase AB₅. Una buena separación de picos permite la detección fiable de formas AB₅ y B₅ en una muestra de proteína de clase AB₅, que a su vez permite la determinación de si una muestra está o no en una forma sustancialmente intacta o asociada, parcialmente disociada o sustancialmente disociada. La detección de proteína AB₅ intacta (integral) en el eluato de columna, representada por un pico sustancialmente sencillo en el cromatograma resultante con un tiempo de retención (TR) correspondiente a AB₅, indica estabilidad funcional sustancial de la muestra de proteína AB₅ procesada en la columna. La detección tanto de proteína AB₅ intacta como de subunidad proteica B₅ en el eluato de columna, representada por dos picos definidos en el cromatograma resultante con tiempos de retención (TR) correspondientes a AB₅ y B₅, indica una disociación parcial de la muestra de proteína AB₅. La detección de subunidad de proteína B₅ en el eluato de columna, representado por un pico sencillo en el cromatograma resultante con un tiempo de retención (TR) correspondiente a B₅, indica disociación sustancial de la muestra de proteína AB₅.

Una buena separación de picos también permite la cuantificación fiable de las proporciones de formas AB₅ y B₅ en una muestra de proteína de clase AB₅, que a su vez permite la determinación del grado de integridad de la proteína de clase AB₅ o, desde otra perspectiva, una medida de la estabilidad funcional de la muestra. De acuerdo con principios bien conocidos, las áreas relativas de los picos que representan la proteína AB₅ y subunidad proteica B₅ en el cromatograma representan las proporciones relativas de las formas AB₅ y B₅ en la muestra. Las proporciones relativas de las formas AB₅ y B₅ en la muestra pueden usarse para determinar la estabilidad funcional de la muestra.

Esta medición de estabilidad de la muestra puede presentarse como una relación de integridad. La expresión "Relación de Integridad" se usa en el presente documento para referirse a una relación de proteína AB₅ integral y subunidad B₅ en una muestra. De acuerdo con la presente invención, una proteína de clase AB₅ se considera funcionalmente estable o funcionalmente estabilizada si tiene una relación de integridad de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 2:1 o de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 3,5:1 o de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 4,5:1. Preferentemente la Relación de Integridad para la proteína AB₅ es de al menos 5:1.

Debería entenderse que en un caso en el que la cantidad de subunidad B₅ en la muestra es tan pequeña que es indetectable usando el procedimiento analítico de la presente invención, la relación de integridad puede no ser una medida significativa, pero la proteína AB₅ se considera estable. Sin embargo, la sensibilidad del procedimiento es tal que son detectables niveles de subunidad B₅ parcialmente disociada tan bajos como 3 % usando el procedimiento analítico de la presente invención. En comparación, los procedimientos de la técnica anterior, tales como SDS-PAGE, que no mantienen la integridad estructural de la proteína intacta, generalmente no detectarán menos del 20 % de una forma subunitaria B₅ disociada.

La capacidad de separar de forma fiable y cuantificable las formas AB₅ y B₅ de una proteína de clase AB₅ usando una técnica no disociativa, tal como una técnica de cromatografía líquida, tal como un material de cromatografía líquida de alto rendimiento con filtración en gel (GF-HPLC) configurada para resolver la proteína AB₅ de la subunidad proteica B₅ permite una diversidad de ensayos útiles y otras técnicas útiles en el desarrollo de fármacos, particularmente vacunas, e investigación general sobre la estructura y estabilidad proteicas. Aunque se conoce en la técnica la cromatografía de exclusión de tamaño acuosa de alto rendimiento (HPASEC) (véase por ejemplo, Perez-Paya y col (1991) J of Chromatography 548: 93-104), la aplicación de HPASEC para la separación de formas AB₅ y B₅ de una proteína de clase AB₅ no se ha desvelado ni sugerido en la técnica anterior. Sin desear quedar ligado a la teoría, el mecanismo de elución de la mayoría de los biopolímeros en soportes de HPASEC se desvía de un mecanismo de exclusión de tamaño puro, principalmente debido a varios efectos secundarios, incluyendo exclusión de iones e intercambio iónico, interacción hidrófoba y formación de enlaces de hidrógeno que se origina a partir de interacciones de matriz-soluto específicas. La validez del sistema de separación puede definirse por atribución de picos del cromatograma que puede realizarse por una cualquiera de las siguientes técnicas incluyendo SDS-PAGE, determinación de peso molecular aparente, dispersión de la luz (MALLS) y Espectrometría de Masas de Electrofocalización de Cromatografía Líquida (CL-ESI-EM). De hecho como demuestran los Ejemplos, se han verificado pruebas de que la integridad de la proteína AB₅ se ha mantenido usando técnicas tales como Análisis Dimensionales, Análisis de Dispersión de la Luz (MALLS) y CL-ESI-EM.

Ensayo de Agente de Estabilización e Identificación de Agentes de Estabilización

La identificación de un agente estabilizador de proteínas de clase AB₅, facilita el uso de, por ejemplo, proteínas de clase AB₅ en composiciones, tales como vacunas, en las que la integridad de la proteína bARE intacta es importante para la eficacia del producto final terapéutico. El procedimiento de separación de la presente invención puede aprovecharse para proporcionar un ensayo para la identificación de agentes de estabilización candidatos. La exploración de agentes de estabilización candidatos es un área bien conocida y pueden desarrollarse fácilmente implementaciones de alto rendimiento de ensayos de exploración dada una metodología de exploración particular. La presente invención proporciona una metodología tal.

El ensayo de exploración de la presente invención es un método para identificar un agente de estabilización de proteínas AB₅. El ensayo implica combinar un agente de estabilización candidato con una proteína de clase AB₅ para

formar una muestra de proteína AB₅. Un agente de estabilización candidato puede ser un compuesto sencillo o combinación de compuestos en un cierto régimen de condiciones, por ejemplo, pH, concentración, etc. Como ejemplo, el agente estabilizador candidato puede seleccionarse del grupo que consiste en tampones estabilizadores candidatos que funcionan en diferentes intervalos de pH o agentes estabilizadores candidatos seleccionados del grupo que consiste en azúcares amorfos, azúcares cristalinos o diversos agentes tensioactivos cargados y no cargados tales como detergentes. Un candidato a agente de estabilización que estabiliza o potencia la estabilización física de la muestra de proteína AB₅ es un agente de estabilización físico de proteína AB₅.

Cuando la muestra se aplica a una columna de cromatografía líquida de alto rendimiento con filtración en gel configurada para resolver, por ejemplo, una proteína AB₅ de la subunidad proteica B₅, la columna se eluye con un tampón iónico, como se ha descrito anteriormente en relación con el procedimiento de separación. También como se ha descrito anteriormente, se detecta una o más de las proteínas AB₅ sustancialmente intactas (no disociadas), subunidades proteicas B₅ parcialmente disociadas y/o subunidades monoméricas Bm sustancialmente disociadas en el eluato de columna y, basándose en los resultados de esta detección, se determina si el agente de estabilización candidato es capaz de estabilizar una proteína AB₅ por lo que respecta a estabilizar funcionalmente la proteína AB₅. Un candidato a agente de estabilización que estabiliza o potencia la estabilización funcional de la muestra de proteína AB₅ es un agente de estabilización funcional de proteína AB₅.

La determinación de si el agente de estabilización candidato estabiliza o potencia la estabilización de la proteína AB₅ puede incluir calcular una relación de integridad para la muestra proteica, siendo la Relación de Integridad una relación de proteína AB₅ sustancialmente integral y subunidad B₅ parcialmente disociada y/o subunidad monomérica Bm sustancialmente disociada y comparar la Relación de Integridad de la muestra con una Relación de Integridad para un control sin el candidato a agente de estabilización. La relación de integridad también puede usarse para cuantificar el alcance de la estabilización conferida por un agente de estabilización identificado.

Pueden ensayarse bibliotecas de candidatos a agentes de estabilización de acuerdo con este procedimiento de una manera de alto rendimiento para identificar eficazmente agentes de estabilización de proteínas AB₅. Los candidatos a agente de estabilización pueden combinarse con una diversidad de proteínas bARE, tales como proteínas AB₅, para determinar diferencias en la capacidad de estabilización y alcance de un candidato a agente de estabilización dado entre diferentes muestras de proteína AB₅. Típicamente el procedimiento analítico de la presente invención se usa en una proteína bARE estabilizada, preferentemente físicamente estabilizada para identificar agentes capaces de estabilizar funcionalmente una proteína bARE. Como alternativa, el procedimiento analítico de la presente invención puede usarse para determinar si los agentes de estabilización física identificados tienen un impacto sobre la estabilidad funcional de una proteína bARE.

Como demuestran los Ejemplos, se seleccionaron diversos tampones, tales como tampones Acetato, pH 5,5, Citrato, pH 6,5, Fosfato y Tris (intervalo de pH de aproximadamente 6-8). La concentración de NaCl se varió en el intervalo de 0-0,5 M; el pH se varió en el intervalo de 5,5-7,5. Se usaron diversos aditivos tales como azúcares, detergentes, quelantes y aminoácidos. Como la estabilización física de una proteína puede estar en función de su concentración proteica (es decir, a medida que aumenta la concentración de proteína bARE, tal como una proteína AB₅, entonces la probabilidad de la precipitación proteica o cristalización aumenta), el efecto de agentes de estabilización candidatos se evaluó usando un intervalo de concentración de proteínas de 0,8-1,2 mg/ml y de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml para volumen concentrado purificado de un mutante AB₅, tal como LTK63 (que se analiza posteriormente) en todos los tampones de almacenamiento usados.

Algunos de los aminoácidos candidato que se evaluaron como agentes de estabilización se exponen en la siguiente Tabla 8. Como muestra la Tabla 8, pueden hacerse selecciones de aminoácidos como agentes estabilizadores candidatos basándose en su polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Los aminoácidos cargados posteriormente incluyen lisina y arginina. Los aminoácidos con grupos funcionales polares no cargados que tienen hidrofilia similar incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparaginas, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Tabla 8

Propiedad		Aminoácidos
pequeño		Ala, Gly
ácido / amida		Asp, Glu, Asn, Gln
cargado	negativo	Asp, Glu
	positivo	Lys, Arg
polar		Ala, Gly, Ser, Thr, Pro
hidrófobo		Val, Leu, Ile, Met
tamaño	grande	Glu, Gin, His, He, Lys, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr
	pequeño	Ala, Asn, Asp, Cys, Gly, Pro, Ser, Thr, Val
alifático		Ile, Leu, Val
aromático		His, Phe, Tyr, Trp

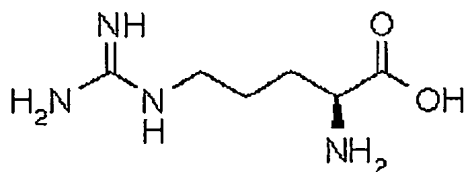
Algunos de los azúcares candidatos que se evaluaron se seleccionaron de excipientes amorfos tales como dextrosa, sacarosa, lactosa, trehalosa y galactosa. Algunos otros azúcares candidatos que se evaluaron se seleccionaron de excipientes cristalinos tales como alcoholes de azúcares incluyendo manitol, sorbitol y alitol. Estos agentes candidatos se seleccionaron porque se sabe en la técnica que estos azúcares son capaces de estabilizar proteínas usadas como agentes farmacéuticos durante el procedimiento de liofilización por pulverización y durante almacenamiento a largo plazo (véase por ejemplo documento WO 02/101412). Sin embargo, existen algunos informes conflictivos sobre los beneficios de un excipiente amorfo con respecto a estabilización.

De hecho, algunos estudios han mostrado que la adición de excipientes amorfos a soluciones proteicas puede de hecho desestabilizar una proteína a través de interacciones entre el excipiente y la proteína (véase por ejemplo, Pike y col Biopharm 1990 3: 2629 y documento WO 01/41800).

Como demuestran los Ejemplos, no todos los agentes estabilizadores candidatos fueron útiles en la estabilización de proteínas bARE. Como ejemplo, mientras que la adición de sacarosa 5 % a PBS parecía proteger un mutante de AB5, tal como LTK63, de la disociación en un ciclo de congelación/descongelación, el almacenamiento de LTK63 en PBS a -20 °C más sacarosa 5 % durante no menos de un año dio como resultado algo de recurrencia de la disociación proteica. Sin embargo, se identificaron algunos agentes que fueron capaces de estabilizar la proteína bARE como se determinó usando los procedimientos de la presente invención.

La inclusión de un agente no cargado para estabilizar funcionalmente una proteína AB5 es ventajosa porque potencia la asociación estable de las formas subunitarias. Esta es la primera vez que se ha identificado un agente que puede estabilizar funcionalmente o potenciar la estabilización funcional de una proteína bARE. Hasta ahora, no ha estado disponible ningún procedimiento para evaluar la estabilidad funcional de una proteína bARE, tal como una proteína AB5, sin pérdida de la estructura integral. Como no está disponible en ningún procedimiento analítico, no puede identificarse ningún agente estabilizador funcional tal.

La arginina es un aminoácido esencial que tiene un grupo guanidino cargado positivamente. Generalmente se indica por el código de tres letras ARG o el símbolo de una letra R. Su nombre IUPAC es ácido 2-amino-5-guanidino pentanoico. El grupo guanidino de cadena lateral está cargado positivamente a pH 7; por lo tanto la arginina es un aminoácido "básico" y es extremadamente hidrófilo. La estructura lineal para la arginina es: $\text{HN}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{-NH}(\text{CH}_2)_3\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$



Hay 6 codones en el código genético para arginina que son: AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGT.

Siguiendo los protocolos desvelados, por ejemplo, en los Ejemplos 4-12 posteriores, el experto en la materia puede evaluar un intervalo de concentraciones deseadas de la base aminoacídica descrita en el presente documento.

Preferentemente la cantidad de base aminoacídica incorporada en la composición está dentro de un intervalo de concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 400 mM, preferentemente de aproximadamente 130 mM a aproximadamente 375 mM, más preferentemente de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 350 mM, incluso más preferentemente de aproximadamente 175 mM a aproximadamente 325 mM, aún más preferentemente de aproximadamente 180 mM a aproximadamente 300 mM, aún más preferentemente de aproximadamente 190 mM a aproximadamente 280 mM, más preferentemente de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 260 mM, dependiendo de la proteína presente en la composición.

En algunas situaciones, una proteína bARE puede ser funcionalmente estable, (por ejemplo, su integridad puede mantenerse) pero puede no ser físicamente estable (por ejemplo, puede precipitarse en solución). En otras situaciones, una proteína bARE puede ser físicamente estable (por ejemplo puede estar en solución) pero puede no ser funcionalmente estable (es decir puede disociarse parcialmente en formas AB5 y B5).

Como demuestran los Ejemplos, se ha determinado que un aminoácido cargado, tal como L-Arginina o derivados de L-Arginina, tales como fosfato de Arginina, son agentes de estabilización útiles para LTK63, en particular a concentración de aproximadamente 100 a aproximadamente 400 mM. Otro agente estabilizador útil comprende una combinación de un aminoácido cargado, tal como L-Arginina o fosfato de Arginina y un detergente zwitteriónico de sulfobetaina, tal como CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato), en particular CHAPS aproximadamente 0,05 % con fosfato de arginina aproximadamente 200 mM. Con respecto a capacidad de estabilización funcional, estos agentes de estabilización pueden conseguir una Relación de Integridad de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 2:1, de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 3,5:1 o de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 4,5:1 para LTK63. Preferentemente la Relación de Integridad para LTK63 es de aproximadamente 10:1.

Sin desear quedar ligado a la teoría, la estabilidad aumentada de la composición de bARE por la inclusión de aminoácidos puede conseguirse a través de la influencia del aminoácido en la estabilidad del polipéptido bARE, más particularmente su influencia en la precipitación de proteína bARE. Además, la incorporación de un agente zwitteriónico como se ha definido en el presente documento dentro de la composición de polipéptidos bARE da como resultado una composición que comprende una proteína bARE que se mantiene sustancialmente en su forma nativa intacta y cuya integridad puede medirse usando el procedimiento analítico de la presente invención.

La combinación de arginina en su forma de base libre o en su forma de sal con un derivado de colesterol con un ácido carboxílico da como resultado una composición de bARE que es ventajosa porque da como resultado aumento de la estabilidad en relación con una composición de bARE preparada sin la combinación de estos dos componentes. El efecto estabilizador sinérgico conseguido es completamente inesperado a la vista de las divulgaciones de la técnica anterior. Además, esta composición estabilizada es ventajosa porque puede conseguirse estabilidad en ausencia de Albúmina de Suero Humano (HSA) como un agente estabilizador y/o solubilizador.

Habiendo identificado las ventajas de composiciones de la invención está dentro de la experiencia en la técnica determinar, sin experimentación indebida, concentraciones preferidas de cada uno de estos componentes para incorporar en la composición para conseguir aumento de la estabilidad del polipéptido durante el almacenamiento de esa composición.

Siguiendo los protocolos desvelados, por ejemplo, en el Ejemplo 1 posterior, el experto puede evaluar un intervalo de concentraciones deseadas de la base aminoacídica y el agente zwitteriónico descritos en el presente documento. Preferentemente la cantidad de base aminoacídica incorporada en la composición está dentro de un intervalo de concentraciones de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 400 mM, preferentemente de aproximadamente 130 mM a aproximadamente 375 mM, más preferentemente de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 350 mM, incluso más preferentemente de aproximadamente 175 mM a aproximadamente 325 mM, aún más preferentemente de aproximadamente 180 mM a aproximadamente 300 mM, aún más preferentemente de aproximadamente 190 mM a aproximadamente 280 mM, más preferentemente de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 260 mM, dependiendo de la proteína presente en la composición.

Siguiendo los protocolos desvelados, por ejemplo, en los Ejemplos 4-12 posteriores, el experto en la materia puede evaluar un intervalo de concentraciones deseadas del agente zwitteriónico descrito en el presente documento. Preferentemente la cantidad de agente zwitteriónico incorporado en la composición está dentro de un intervalo de

concentraciones de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 0,5 %, preferentemente de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 0,4 %, más preferentemente de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 0,35 %, aún más preferentemente aproximadamente 0,25 %.

5 Las composiciones estabilizadas de la invención pueden contener otros compuestos que aumentan la eficacia o promueven las cualidades deseables del polipéptido de interés bARE AB5 que actúa como un componente terapéuticamente activo siempre que no se vea afectado de forma negativa el efecto estabilizador. La composición debe ser segura para administración mediante la vía que se seleccione, debe ser estéril y debe conservar su actividad terapéutica deseada.

10 La composición puede comprender adicionalmente un agente solubilizador o potenciador de la solubilidad que contribuya a la solubilidad de la proteína más allá de la solubilidad potenciada obtenida usando las formulaciones de fuerza iónica baja desveladas en el presente documento. Se analizan agentes de solubilización adecuados adicionales en las Patentes de Estados Unidos N° 4.816.440; 4.894.330; 5.004.605; 5.183.746; 5.643.566; y en Wang y col. (1980) J. Parenteral Drug Assoc. 34: 452-462.

15 La composición puede comprender adicionalmente detergentes no iónicos. Los ejemplos de detergentes no iónicos incluyen pero sin limitación detergentes que contienen grupos funcionales no cargados, hidrófilos que consisten en restos de polioxietileno tales como, pero sin limitación, Brij® y Triton® (tales como por ejemplo, Triton-X, NP-40, Brij, Tween) o grupos glucosídicos tales como pero sin limitación octil glucósido y dodecil maltósidos (tales como, por ejemplo, Octil-B-Tioglucopiranosido). Sin desear quedar ligado a la teoría, los detergentes no iónicos son ventajosos porque se consideran detergentes "suaves" que se considera que son no desnaturizantes y se usan ampliamente en el aislamiento de proteínas de membrana en su forma biológicamente activa porque casi nunca desnaturizan proteínas mientras las solubilizan.

Estabilidad de almacenamiento

La invención permite aumentar la estabilidad de almacenamiento de una composición de bARE cuando esa composición comprende una proteína bARE que forma agregados durante el almacenamiento.

25 Por "aumentar la estabilidad de almacenamiento" se entiende que la formación de agregados y/o disociación del polipéptido de bARE durante el almacenamiento de la composición de bARE se minimiza en relación con la formación de agregados y/o disociación del polipéptido de bARE durante el almacenamiento en ausencia de uno o más agentes estabilizadores descritos en el presente documento.

30 La minimización de la formación de agregados y/o disociación de una proteína bARE con adición de una base aminoacídica o agente zwitteriónico puede producirse de una manera dependiente de concentración. Es decir, concentraciones crecientes de la base aminoacídica y/o agente zwitteriónico pueden conducir a aumento de la estabilidad del polipéptido de bARE en una composición cuando ese polipéptido muestra normalmente formación de agregados y/o disociación durante el almacenamiento en una composición en ausencia de la base aminoacídica y/o agente zwitteriónico. La determinación de la cantidad a añadir a una composición bARE para minimizar la formación de agregados y/o disociación aumentando de este modo la estabilidad de los polipéptidos, y aumentando así la estabilidad de almacenamiento de la composición, puede determinarse fácilmente para cualquier polipéptido bARE particular de interés sin experimentación indebida usando procedimientos generalmente conocidos por los expertos en la materia.

También es deseable aumentar la estabilidad de almacenamiento de una composición bARE a lo largo del tiempo.

40 La composición bARE de la presente invención demuestra estabilidad de almacenamiento aumentada.

Preferentemente la estabilidad de almacenamiento aumentada se observa durante un periodo de aproximadamente 4 meses a aproximadamente 8 meses.

Preferentemente la estabilidad de almacenamiento aumentada se observa durante un periodo de aproximadamente 1 año.

45 Preferentemente la composición bARE tiene un periodo de caducidad de al menos aproximadamente 18 meses, más preferentemente al menos 20 meses, aún más preferentemente al menos aproximadamente 22 meses, más preferentemente al menos aproximadamente 24 meses cuando se almacena a 2-8.

50 La estabilidad de almacenamiento de una composición de bARE preparada de acuerdo con los procedimientos de la invención puede evaluarse usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Típicamente, la estabilidad de almacenamiento de tales composiciones se evalúa usando perfiles de estabilidad de almacenamiento. Estos perfiles se obtienen controlando los cambios en la cantidad de proteína bARE presente en su forma molecular no agregada, no disociada biológicamente activa y su potencia a lo largo del tiempo en respuesta a la variable de interés, tal como concentración de pH, agente estabilizador, concentración de agente estabilizador, etc., como se demuestra en los ejemplos posteriores. Estos perfiles de estabilidad pueden generarse a varias temperaturas representativas de posibles condiciones de almacenamiento, tales como temperatura de congelación, temperatura

refrigerada, temperatura ambiente o temperatura elevada, tal como a 40-50 °C. La estabilidad de almacenamiento puede después compararse entre perfiles determinando, por ejemplo, la semivida de la forma molecular no agregada, biológicamente activa, no disociada del polipéptido bARE de interés.

- 5 Por "semivida" se entiende el tiempo necesario para una reducción del 50 % de la forma molecular biológicamente activa no agregada del polipéptido de interés. Las composiciones que comprenden una base de arginina y un agente zwitteriónico preparados de acuerdo con los procedimientos de la presente invención tendrán una semivida que es al menos de aproximadamente dos veces a aproximadamente diez veces mayor, preferentemente de al menos aproximadamente tres veces a al menos aproximadamente 10 veces mayor, más preferentemente de al menos aproximadamente cuatro veces a aproximadamente diez veces mayor, más preferentemente de al menos
- 10 aproximadamente cinco veces a aproximadamente diez veces mayor que la semivida de una composición preparada en ausencia de una base aminoacídica, o una base aminoacídica más uno o más de los agentes estabilizadores adicionales descritos en el presente documento, en combinación con un aceite zwitteriónico. Para fines de la presente invención, una composición que tiene estabilidad de almacenamiento aumentada como resultado de prepararse de acuerdo con la presente invención se considera una composición bARE "estabilizada".
- 15 Sin desear quedar ligado a una teoría, el aumento de la estabilidad de almacenamiento de las composiciones que contienen polipéptidos bARE estabilizadas de la invención también pueden asociarse con los efectos inhibidores de la base aminoacídica en la desaminación de restos de glutamina y/o asparagina dentro del polipéptido bARE terapéuticamente activo durante el almacenamiento. El efecto de una base aminoacídica particular sobre la desamidación de estos restos durante el almacenamiento en una composición de bARE puede determinarse
- 20 fácilmente controlando la cantidad de polipéptido de bARE presente en la forma desamidada a lo largo del tiempo. Se conocen en la técnica generalmente procedimientos para medir especies moleculares, es decir, nativas o desamidadas, de un polipéptido bARE particular. Tales procedimientos incluyen separación cromatográfica de la especie molecular e identificación usando patrones de peso molecular polipeptídicos, tales como RP HPLC.

PROTEÍNA bARE

- 25 Las proteínas bARE en la clase AB5 pueden usarse de forma individual o en combinación con otras moléculas biológicas.

El término "proteína" como se usa en el presente documento abarca polipéptidos y proteínas de origen natural (nativos), sintéticos y recombinantes, y variantes biológicamente activas y análogos de los mismos, según se califican en otro punto en el presente documento. El término "proteína" también incluye polipéptidos y péptidos que

30 se conjugan con otras moléculas biológicas. Por "componente terapéuticamente activo" se entiende la proteína o polipéptido que se incorpora específicamente en la composición de bARE de la presente invención para provocar una respuesta terapéutica deseada con respecto a tratamiento, prevención o diagnóstico de una enfermedad o afección dentro de un sujeto cuando la composición de bARE se administra a ese sujeto.

Los polipéptidos de la invención pueden prepararse por diversos medios (por ejemplo expresión recombinante, purificación de cultivo celular, síntesis química, etc.) y en diversas formas (por ejemplo nativa, fusiones, no glucosilada, lipidada, etc.). Preferentemente se preparan en forma sustancialmente pura (es decir sustancialmente sin otras proteínas de la célula huésped). La invención también proporciona un procedimiento para producir un polipéptido de la invención, que comprende la etapa de cultivar una células huésped transformada con ácido nucleico de la invención en condiciones que inducen expresión de polipéptidos.

35

Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" se refiere a oligonucleótidos y polinucleótidos, e incluye ADN y ARN. La expresión "secuencia de nucleótidos (NOI)" es sinónima de la expresión "polinucleótido" o "ácido nucleico". La NOI puede ser ADN o ARN de origen genómico o sintético o de origen recombinante. La NOI puede ser bicatenaria o monocatenaria representando la hebra sentido o antisentido o combinaciones de las mismas. Para algunas aplicaciones, preferentemente, la NOI es ADN. Para algunas aplicaciones, preferentemente,

40 la NOI se prepara por uso de técnicas de ADN recombinante (por ejemplo ADN recombinante). Para algunas aplicaciones, preferentemente, la NOI es ADNc. Para algunas aplicaciones, preferentemente, la NOI puede ser la misma que la forma de origen natural. La expresión "ácido nucleico" incluye ADN y ARN, y también sus análogos, tales como los que contienen cadenas principales modificadas (por ejemplo fosforotioatos, etc.) y también ácidos peptidonucleicos (PNA), etc. La invención incluye ácido nucleico que comprende secuencias complementarias a las descritas anteriormente (por ejemplo para fines antisentido o de exploración).

45

50

El ácido nucleico de acuerdo con la invención puede prepararse de muchas maneras (por ejemplo por síntesis química, a partir de bibliotecas genómicas o de ADNc, a partir del organismo en sí mismo, etc.) y puede tomar diversas formas (por ejemplo monocatenario, bicatenario, vectores, sondas, etc.). Preferentemente están en forma sustancialmente pura (es decir sustancialmente sin otras proteínas o ácido nucleicos de la célula huésped).

- 55 Las variantes biológicamente activas de una proteína bARE que actúa como un componente terapéuticamente activo en las composiciones de la invención también están abarcadas por la expresión "proteína bARE" como se usa en el presente documento. Tales variantes deberían conservar la actividad biológica deseada de la proteína bARE nativa de modo que la composición que comprende el polipéptido variante tenga el mismo efecto terapéutico que la

composición que comprende el polipéptido nativo cuando se administra a un sujeto. Es decir, el polipéptido variante actuará como un componente terapéuticamente activo en la composición de una manera similar a la observada para la proteína bARE nativa.

Las variantes pueden incluir pero sin limitación situaciones en las que la secuencia de aminoácidos primaria del polipéptido puede aumentarse por derivatización usando restos de azúcar (glucosilación) o por otras moléculas complementarias tales como lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares. También puede aumentarse por conjugación con sacáridos. Ciertos aspectos de dicho aumento se consiguen a través de sistemas de procesamiento postraduccionales del huésped productor; otras modificaciones tales pueden introducirse *in vitro*. En cualquier caso, tales modificaciones se incluyen en la definición de polipéptido usada en el presente documento siempre que la actividad del polipéptido no se destruya. Se espera que tales modificaciones puedan afectar cuantitativa o cualitativamente a la actividad, potenciando o disminuyendo la actividad del polipéptido, en los diversos ensayos. Además, pueden modificarse restos aminoácidos individuales en la cadena por oxidación, reducción u otra derivatización, y el polipéptido puede escindirse para obtener fragmentos que conservan la actividad. Tales alteraciones que no destruyen la actividad no retiran la secuencia polipeptídica de la definición de polipéptido de interés como se usa en el presente documento.

La técnica proporciona orientación sustancial con respecto a la preparación y uso de variantes polipeptídicas. Al preparar las variantes polipeptídicas, un experto en la materia puede determinar fácilmente qué modificaciones de la secuencia de aminoácidos o nucleótidos de la proteína nativa darán como resultado una variante que es adecuada para su uso como un componente terapéuticamente activo de una composición farmacéutica de la presente invención y cuya formación de agregados se reduce por la presencia de una base aminoácídica y un ácido sustancialmente sin su forma de sal, la forma de sal del ácido o una mezcla de ácido y su forma de sal como se ha descrito en el presente documento. Por ejemplo, están disponibles procedimientos en la técnica para determinar si un polipéptido variante conserva la actividad biológica deseada, y por lo tanto actúa como un componente terapéuticamente activo en la composición. Puede medirse la actividad biológica usando ensayos específicamente diseñados para medir la actividad del polipéptido nativo o proteína, incluyendo ensayos descritos en la presente invención. Adicionalmente, pueden ensayarse anticuerpos inducidos contra un polipéptido nativo biológicamente activo con respecto a su capacidad para unirse al polipéptido variante, siendo la unión eficaz indicativa de un polipéptido que tiene una conformación similar a la del polipéptido nativo.

Las variantes biológicamente activas adecuadas de un polipéptido nativo o de origen natural de interés pueden ser fragmentos, análogos y derivados de ese polipéptido. Por "fragmento" se entiende un polipéptido que consiste en solamente una parte de la secuencia y estructura del polipéptido intacta, y puede ser una delección C terminal o delección N terminal del polipéptido nativo.

Por "análogo" se entiende un análogo del polipéptido nativo o de un fragmento del polipéptido nativo, comprendiendo el análogo una secuencia y estructura polipeptídica nativa que tiene una o más sustituciones, inserciones o delecciones de aminoácidos. Las "muteínas", tales como las descritas en el presente documento, y péptidos que tienen uno o más peptoides (miméticos peptídicos) también están abarcadas por el término análogo (véase, por ejemplo Publicación Internacional de PCT N° WO 91/04282).

Por "derivado" se entiende cualquier modificación adecuada del polipéptido nativo de interés, de un fragmento del polipéptido nativo o de sus análogos respectivos, tales como glucosilación, fosforilación u otra adición de restos ajenos, siempre que se conserve la actividad biológica deseada del polipéptido nativo. Están generalmente disponibles en la técnica procedimientos para preparar fragmentos, análogos y derivados del polipéptido.

Por ejemplo, pueden prepararse variantes de secuencia de aminoácidos del polipéptido por mutaciones en la secuencia de ADN clonada que codifica el polipéptido nativo de interés.

Se conocen bien en la técnica procedimientos para mutagénesis y alteraciones de secuencia de nucleótidos. Véase, por ejemplo, Walker y Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nueva York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492; Kunkel y col. (1987) *Methods Enzymol.* 154: 367-382; Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, Nueva York); Patente de Estados Unidos N° 4.873.192; y las referencias citadas en las mismas. Puede encontrarse orientación sobre las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan a la actividad biológica del polipéptido de interés en el modelo de Dayhoff y col. (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D. C.).

Pueden preferirse sustituciones conservativas, tales como intercambiar un aminoácido con otro que tenga propiedades similares. Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen, pero sin limitación, Gly a Ala, Val a Ile a Leu, Asp a Glu, Lys a Arg, Asn a Gln, y Phe a Tyr. Para construir variantes del polipéptido de interés, se realizan modificaciones tales que las variantes continúan poseyendo la actividad deseada. Obviamente, cualquier mutación realizada en el ADN que codifica el polipéptido variante no debe situar la secuencia fuera de la fase de lectura y preferentemente no creará regiones complementarias que podrían producir estructura de ARNm secundaria. Véase la Publicación de Solicitud de Patente de EP N° 75.444.

Las variantes biológicamente activas de un polipéptido de interés generalmente tendrán al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente aproximadamente 90 % a 95 % o más y más preferentemente aproximadamente 98 % o más identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la molécula polipeptídica de referencia, que actúa como la base para la comparación. Una variante biológicamente activa de un polipéptido nativo de interés puede diferir del polipéptido nativo por tan poco como 1-15 aminoácidos, tan poco como 1-10, tales como 6-10, tan poco como 5, tan poco como 4, 3, 2 o incluso 1 resto aminoacídico.

Las proteínas (incluyendo antígenos proteicos) como se usan en la invención pueden tener homología y/o identidad de secuencia con formas de origen natural. Las secuencias que codifican de forma similar capaces de expresar tales proteínas generalmente tendrán homología y/o identidad de secuencia con secuencias de origen natural. También se conocen en la materia técnicas para determinar la "identidad de secuencia" de ácido nucleico y aminoácidos. Típicamente, tales técnicas incluyen determinar la secuencia de nucleótidos del ARNm para un gen y/o determinar la secuencia de aminoácidos codificada de este modo, y comparar estas secuencias con una segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos.

En general, el término "identidad" se refiere a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas, respectivamente. Dos o más secuencias (de polinucleótidos o aminoácidos) pueden compararse determinando su "porcentaje de identidad". El porcentaje de identidad de dos secuencias, sean secuencias de ácido nucleico o aminoácidos, es el número de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas dividido por la longitud de las secuencias más cortas y multiplicado por 100.

Para los fines de alineamiento óptimo de las dos secuencias, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos de la variante puede tener restos aminoacídicos adicionales o restos aminoacídicos delecionados con respecto a la secuencia de aminoácidos de la molécula de referencia. El segmento contiguo usado para comparación con la secuencia de aminoácidos de referencia comprenderá al menos veinte (20) restos aminoacídicos contiguos, y puede ser de 30, 40, 50, 100 o más restos. Pueden realizarse correcciones con respecto a identidad de secuencia aumentada asociada con inclusión de huecos en la secuencia de aminoácidos de la variante asignando penalizaciones de hueco. Se conocen bien en la técnica procedimientos de alineamiento de secuencias tanto para secuencias de aminoácidos como para secuencias de nucleótidos que codifican secuencias de aminoácidos.

Por lo tanto, la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias cualesquiera puede conseguirse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) CABIOS 4: 11-17. Un algoritmo tal se utiliza en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de software de alineamiento de secuencias GCG. Puede usarse una tabla de peso de restos PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12, y una penalización de hueco de 4 con el programa ALIGN cuando se comparan secuencias de aminoácidos. Otro ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático para su uso en la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877. Un algoritmo tal se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas de una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de interés. Pueden realizarse búsquedas de proteínas BLAST con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas del polipéptido de interés. Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, puede utilizarse BLAST con huecos como se ha descrito en Altschul y col. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389. Como alternativa, puede usarse PSI-Blast para realizar una búsqueda iterativa que detecta relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul y col. (1997) mencionado anteriormente. Cuando se utilizan los programas BLAST, BLAST con huecos y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Véase también el programa ALIGN (Dayhoff (1978) en Atlas of Protein Sequence and Structure 5:Supl.3 (National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C.) y programas en el Paquete de Análisis de Secuencias de Wisconsin, Versión 8 (disponible de Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin), por ejemplo, el programa GAP, en el que se utilizan parámetros por defecto de los programas.

También se proporciona un alineamiento aproximado para secuencias de ácido nucleico por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2: 482-489 (1981). Este algoritmo puede aplicarse a secuencias de aminoácidos usando la matriz de puntuación desarrollada por Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure, M. O. Dayhoff ed., 5 supl.3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C., Estados Unidos, y normalizada por Gribskov, Nucl. Acids Res. 14(6): 6745-6763 (1986). Una implementación ejemplar de este algoritmo para determinar el porcentaje de identidad de una secuencia se proporciona por el Genetics Computer Group (Madison, WI) en la aplicación de utilidad "BestFit". Los parámetros por defecto para este procedimiento se describen en el Manual del Programa de Paquete de Análisis de Secuencias de Wisconsin, Versión 8 (1995) (disponible de Genetics Computer Group, Madison, WI). Un procedimiento preferido para establecer el porcentaje de identidad en el contexto de la presente invención es usar el paquete de programas MPSRCH con copyright de la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). De este conjunto de paquetes puede emplearse el algoritmo

Smith-Waterman en el que se usan parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización de hueco abierto de 12, penalización de extensión de hueco de uno y un hueco de seis). De los datos generados el valor "coincidencia" refleja la "identidad de secuencia". Se conocen en general en la técnica otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias, por ejemplo, otro programa de alineamiento es BLAST, usado con parámetros por defecto. Por ejemplo, pueden usarse BLASTN y BLASTP usando los siguientes parámetros por defecto: código genético = convencional; filtro = ninguno; hebra = ambas; punto de corte = 60; expectativa = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; clasificar por = ALTA PUNTUACIÓN; bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR. Los detalles de estos programas pueden encontrarse en la siguiente dirección de Internet: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

Cuando se considera el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos, algunas posiciones de restos aminoácidos pueden diferir como resultado de sustituciones de aminoácidos conservativas, que no afectan a las propiedades de la función proteica. En estos casos, el porcentaje de identidad de secuencia puede ajustarse hacia arriba para explicar la similitud de aminoácidos sustituidos de forma conservativa. Tales ajustes se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Myers y Miller (1988) Computer Applic. Biol. Sci. 4:11-17.

La estructura química precisa de un polipéptido depende de varios factores. Puesto que están presentes grupos carboxilo y amino ionizables en la molécula, puede obtenerse un polipéptido particular como una sal ácida o básica, o en forma neutra.

Todas las preparaciones tales que conservan su actividad biológica cuando se colocan en condiciones ambientales adecuadas se incluyen en la definición de polipéptidos como se usa en el presente documento.

Como alternativa, puede determinarse la homología por hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dobles cadenas estables entre regiones homólogas, seguido de digestión con nucleasa o nucleasas específicas de cadena sencilla, y determinación de tamaño de los fragmentos digeridos. Dos secuencias de ADN o dos polipeptídicas son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando las secuencias muestran al menos aproximadamente 80 %-85 %, preferentemente al menos aproximadamente 90 % y más preferentemente al menos aproximadamente 95-98 % de identidad de secuencia sobre un tramo definido de las moléculas, como se determina usando los procedimientos anteriores.

Como se usa en el presente documento, sustancialmente homólogo u homólogo también se refiere a secuencias que muestran identidad completa con la secuencia de ADN o polipeptídica especificada. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas u homólogas pueden identificarse en un experimento de hibridación de Southern en, por ejemplo, condiciones rigurosas, como se definen para ese sistema particular. Por ejemplo, las condiciones de hibridación rigurosas pueden incluir formamida al 50 %, Solución de Denhardt 5x, SSC 5x, SDS 0,1 % y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 pg/ml y las condiciones de lavado pueden incluir SSC 2x, SDS 0,1 % a 37 °C seguido de SSC 1x, SDS 0,1 % a 68 °C. La definición de condiciones de hibridación apropiadas está dentro de la experiencia de la técnica.

Preferentemente el grado de identidad es preferentemente mayor de 50 % (por ejemplo 65 %, 80 %, 90 %, o más) e incluye mutantes y variantes alélicas. La identidad de secuencia entre las proteínas se determina preferentemente por el algoritmo de búsqueda de homólogas Smith-Waterman como se implementa en el programa MPSRCH (Oxford. Molecular), usando una búsqueda de hueco afín con parámetros de penalización de hueco abierto = 12 y penalización de extensión de hueco = 1.

PROTEÍNAS AB5

En una realización preferida de la presente invención, la molécula biológica bARE es un inmunógeno.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunógeno" se refiere a cualquier compuesto capaz de inducir una respuesta inmune celular y/o humoral cuando está en contacto con una célula, e incluye, sin limitación, composiciones inmunogénicas tales como vacunas y composiciones que comprenden inmunógenos. Preferentemente, se induce una respuesta a anticuerpo y una respuesta de linfocitos T. Se esperaría que tales inmunógenos sean útiles en aplicaciones profilácticas y terapéuticas así como para aplicaciones de investigación incluyendo la generación de anticuerpos.

Se conoce bien en la técnica que la toxina del cólera (CT) y las enterotoxinas lábiles por calor de *E. coli* relacionadas (LT), que son productos de secreción de sus cepas bacterianas enterotóxicas respectivas, son potentes inmunógenos y muestran fuerte toxicidad cuando se administran por vía sistémica, vía oral o vía mucosa. Además, se conoce bien que CT y LT pueden proporcionar efectos adyuvantes para antígeno cuando se administran mediante las vías intramuscular u oral. Las dos toxinas son moléculas extremadamente similares, y son al menos aproximadamente 70-80 % homólogas en el nivel de aminoácidos. La importancia relativa de las subunidades A y B para su adyuvancia es controvertida. Hay especulaciones en el campo de que la actividad tóxica de la subunidad A puede modular los efectos adyuvantes asociados con la subunidad B. Algunos estudios demuestran que las mutaciones de la subunidad A anulan la actividad adyuvante mientras que otros muestran que las mutaciones de la subunidad A que bloquea la actividad ADP-ribosilasa no tienen efecto sobre la adyuvancia. Otros informes

muestran diversos niveles de efectos adyuvantes para las subunidades B purificadas o preparaciones de subunidad B recombinante. Es probable que las subunidades A y B tengan funciones separadas que contribuyen de forma independiente a la adyuvancia. Estas funciones son actividad ADP-ribosilasa y actividad desencadenante del receptor, respectivamente.

- 5 La proteína bARE es una proteína AB5.

En una realización preferida, la composición de bARE comprende una proteína AB5 modificada como el agente terapéuticamente activo.

Preferentemente la proteína AB5 modificada tiene una región codificante de subunidad de enterotoxina modificada.

Preferentemente la proteína AB5 tiene una región codificante de subunidad A de enterotoxina modificada.

- 10 Preferentemente la subunidad A modificada se modifica de modo que la región codificante de subunidad A se modifique para interrumpir o inactivar la actividad ADP-ribosil transferasa en el producto expresado (véase, por ejemplo, documento WO 03/004055).

- 15 Como se conocen bien, la toxicidad de la toxina del cólera (CT) y la toxina LT reside en la subunidad A. Preferentemente, la modificación de la subunidad A es una mutagénesis dirigida de restos de sitio activo clave que retira la actividad enzimática tóxica mientras que mantiene la inmunogenicidad. En una realización preferida adicional, la proteína bARE es una proteína AB5 mutante.

- 20 Se conocen varios mutantes de CT y su homólogo LT, que comprenden mutaciones puntuales en la subunidad A en la técnica. Por ejemplo el documento WO 92/19265 desvela mutaciones en la subunidad CTA en Arg-7, Asp-9, Arg-11, His-44, His-70 y Glu-112. El documento WO 93/13202 se refiere a proteínas de CT y LT detoxificadas inmunogénicas que tienen sustituciones en uno o más de los aminoácidos Val-53, Ser-63, Val-97, Tyr-104 o Pro-106. El documento WO 9.5/17211 desvela un mutante de LT con una mutación Lys-7 (LT-K7). El documento WO 96/06627 desvela un mutante de LT en el que la arginina en la posición 192 se sustituye con glicina (mLTR192G). Las mutaciones pueden combinarse. Por ejemplo, la mutación de CT o LT puede tener dos o más mutaciones.

- 25 En una realización particularmente preferida, la proteína AB5 es una subunidad A mutante detoxificada de toxina lábil por calor de *E. coli* (LT) seleccionada de uno o más del grupo que consiste en una LT con una sustitución de serina (S) a lisina (K) en la posición 63 en la subunidad A (LTK63) y una sustitución de alanina (A) a arginina (R) en la posición 72 en la subunidad A (LTR72).

En una realización aún más preferida, la molécula biológica es LTK63.

- 30 Se conocen en la técnica procedimientos para el diseño y producción de mutantes de CT, LT y homólogos de CT y LT, tales como, por ejemplo, mutagénesis dirigida de ADN que codifica las toxinas de tipo silvestre. Como ejemplo, se describen procedimientos adecuados para preparar y usar toxinas que ribosilan ADP detoxificadas como adyuvantes de mucosa en el documento WO 95/172111 y como adyuvantes parenterales en el documento WO 98/42375 así como los documentos WO 93/13202, WO 92/19265.

- 35 El uso de toxinas que ribosilan ADP y derivados detoxificados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede hallarse en las siguientes referencias (Beignon, y col. Infection and Immunity (2002) 70(6):3012 - 3019; Pizza, y col., Vaccine (2001) 19:2534- 2541; Pizza, y col., Int. J. Med. Microbiol (2000) 290(4-5):455-461; Scharton-Kersten y col. Infection and Immunity (2000) 68(9):5306 - 5313; Ryan y col. Infection and Immunity (1999) 67(12):6270 - 6280; Partidos y col. Immunol. Lett. (1999) 67(3):209-216; Peppoloni y col. Vaccines (2003) 2(2):285 - 293; y Pine y col. J. Control Release (2002) 85(1-3):263-270). La referencia numérica para sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de toxinas que ribosilan ADP expuestos en Domenighini y col., Mol. Microbiol (1995) 15(6):1165-1167.

- 45 Aunque la actividad adyuvante de mucosa de CT y LT está bien descrita para numerosos antígenos experimentales administrados por las vías oral, intranasal e intrarrectal, la posible toxicidad y diarrea resultante asociada con la actividad de la subunidad A usando estas vías de administración ha limitado su uso en vacunas humanas. Por otro lado, los trabajadores en el campo han demostrado que la aplicación tópica (tal como administración epicutánea o transcutánea sin perforación de la piel) de CT, etc., no parece dar como resultado los efectos secundarios que se producen con sus usos oral, intranasal y parenteral. Como ejemplo, los trabajadores del campo han mostrado que cuando las exotoxinas que ribosilan ADP, tales como toxina del cólera (CT), enterotoxina lábil por calor de *E. coli* (LT), exotoxina de *Pseudomonas* (ETA), toxina pertussis (PT), cuando se aplicaban de forma epicutánea, eran capaces de pasar a través de la piel e inducir una respuesta inmune. Además, se mostró que CT, LT, ETA y PT actuaban como adyuvantes para inducir una respuesta inmune a antígenos co-administrados en la piel (véase, por ejemplo, documentos WO 98/20734, WO 99/43350, WO 00/61184 y WO 02/064162). Además de LT, también se mostró que los mutantes de LT (LTR 192G, LTR72 y LTK63) se comportaban como adyuvantes fuertes para inmunización transcutánea (Scharton-Kersten y col (2000) Infect and Immunity 68: 5306-5313).

- 55 Se conoce en la técnica que la subunidad B de enterotoxina puede actuar como un inmunomodulador (véase por

ejemplo, documentos WO 97/02045 y US20010036917), un adyuvante (véase, por ejemplo el documento WO 99/58145) y como un vehículo (véase, por ejemplo, el documento WO 03/000899).

Pueden usarse composiciones inmunogénicas (por ejemplo, vacunas) de acuerdo con la presente invención en un procedimiento para tratar un sujeto humano para prevenir o mitigar una infección bacteriana por administración de la composición inmunogénica al sujeto humano.

ADYUVANTES

La composición y/o la proteína bARE de la presente invención pueden administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores. En particular, las composiciones de la presente invención pueden administrarse con un adyuvante. La inclusión de un adyuvante y en particular, un adyuvante genético puede ser útil en la potenciación adicional o modulación de la respuesta CMI. Un adyuvante puede potenciar la respuesta CMI potenciando la inmunogenicidad de un antígeno coadministrado en un sujeto inmunizado, así como induciendo una respuesta inmune de tipo Th1 contra el antígeno coadministrado que es beneficiosa en un producto de composición inmunogénica.

Una respuesta inmune y particularmente una respuesta de CMI puede refinarse, mediante la adición de adyuvantes a combinaciones de antígenos o secuencias de nucleótidos que codifican combinaciones de antígenos que conducen a composiciones particularmente eficaces para inducir una respuesta CMI potenciada de larga duración y prolongada.

Como se usa en el presente documento, el término “adyuvante” se refiere a cualquier material o composición capaz de alterar, mejorar, dirigir, redirigir, potenciar o iniciar de forma específica o no específica una respuesta inmune específica de antígeno.

El término “adyuvante” incluye pero sin limitación una exotoxina que ribosila ADP bacteriana, un factor biológicamente activo, molécula inmunomoduladora, modificador de respuesta biológica o molécula inmunoestimuladora tal como una citocina, una interleucina, una quimiocina o un ligando o un epítipo (tal como un epítipo de linfocitos T auxiliares) y de forma óptima combinaciones de los mismos que, cuando se administran con un antígeno, composición de antígenos o secuencia de nucleótidos que codifica tales antígenos mejora, potencia o modula la respuesta CMI en relación con la respuesta CMI generada tras la administración del antígeno o combinación de antígenos por sí solos. El adyuvante puede ser cualquier adyuvante conocido en la técnica que sea apropiado para uso humano o animal.

Pueden usarse moléculas inmunomoduladoras tales como citocinas (TNF-alfa, IL-6, GM-CSF e IL-2), y moléculas coestimuladoras y accesorias (B7-1, B7-2) como adyuvantes en una diversidad de combinaciones. En una realización no se administra GM-CSF al sujeto antes, en o después del régimen de administración. La producción simultánea de una molécula inmunomoduladora y un antígeno de interés en el sitio de expresión del antígeno de interés puede potenciar la generación de efectores específicos que pueden ayudar a potenciar la respuesta CMI. El grado de potenciación de la respuesta CMI puede depender de las moléculas inmunoestimuladoras específicas y/o adyuvantes usados ya que diferentes moléculas inmunoestimuladoras pueden inducir diferentes mecanismos para potenciar y/o modular la respuesta CMI. Como ejemplo, las diferentes moléculas inmunomoduladoras/mecanismos efectores incluyen pero sin limitación aumento de la señal auxiliar (IL-2), reclutamiento de APC profesional (GM-CSF), aumento de la frecuencia de linfocitos T (IL-2), efecto sobre la ruta de procesamiento de antígenos y expresión de MHC (IFN-gamma y TNF-alfa) y desviación de respuesta inmune de la respuesta de Th1 y hacia una respuesta Th2 (LTB) (véase el documento WO 97/02045). CpG no metilados que contienen oligonucleótidos (véase el documento WO96/02555) también son inductores preferentes de una respuesta Th1 y son adecuados para su uso en la presente invención.

Sin quedar ligado a la teoría, la inclusión de un adyuvante es ventajosa porque el adyuvante puede ayudar a potenciar la respuesta CMI al antígeno expresado desviando la respuesta Th2 a una respuesta Th1 y/o mecanismos asociados efectores específicos para un epítipo expresado con la consecuente generación y mantenimiento de una respuesta CMI prolongada (véase, por ejemplo, las enseñanzas del documento WO 97/02045).

La inclusión de un adyuvante con un antígeno o secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno también es ventajosa porque puede dar como resultado una dosis más baja o dosis más bajas de la combinación antigénica/antígeno siendo necesario conseguir la respuesta CMI deseada en el sujeto al que se administra el antígeno o secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno, o puede dar como resultado una respuesta inmune cualitativa y/o cuantitativamente diferente en el sujeto. La eficacia de un adyuvante puede determinarse administrando el adyuvante con el antígeno en paralelo con el antígeno solo a animales y comparando la inmunidad mediada por anticuerpos y/o células en los dos grupos usando ensayos convencionales tales como radioinmunoensayo, ELISA, ensayos de linfocitos T CD8+ y similares, todos bien conocidos en la técnica. Típicamente, el adyuvante es un resto separado del antígeno, aunque una molécula sencilla (tal como por ejemplo, CTB o un análogo del mismo, tal como LTB) puede tener propiedades tanto adyuvantes como antigénicas.

Como se usa en el presente documento, la expresión “adyuvante genético” se refiere a un adyuvante codificado por una secuencia de nucleótidos y que, cuando se administra con el antígeno potencia la respuesta a CMI en relación

con la respuesta CMI generada tras la administración del antígeno solo.

Pueden usarse toxinas que ribosilan ADP bacteriano y derivados detoxificados como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína deriva de *E. coli* (es decir, enterotoxina lábil por calor de *E. coli* LT), cólera ("CT"), o pertussis ("PT").

- 5 En una realización preferida, el adyuvante genético es una exotoxina que ribosila ADP bacteriana.

Como se ha explicado anteriormente, las toxinas bacterianas que ribosilan ADP son una familia de exotoxinas bacterianas relacionadas e incluyen toxina diftérica (DT), toxina pertussis (PT), toxina del cólera (CT), las toxinas lábiles por calor de *E. coli* (LT1 y LT2), endotoxina A de *Pseudomonas*, exotoxina S de *Pseudomonas*, exoenzima de *B. cereus*, toxina de *B. sphaericus*, toxinas C2 y C3 de *C. botulinum*, exoenzima de *C. limosum*, así como toxinas de *C. perfringens*, *C. spiriformis* y *C. difficile*, EDIN de *Staphylococcus aureus* y mutantes de toxina bacteriana que ribosila ADP tales como CRM₁₉₇, un mutante de toxina diftérica no tóxica (véase, por ejemplo, Bixler y col (1989) Adv. Expo. Med. Biol. 251:175; y Constantino y col (1992) Vaccine). La mayoría de las toxinas bacterianas que ribosilan ADP se organizan como un multímero A:B, en el que la subunidad A contiene la actividad ADP-ribosiltransferasa y la subunidad B actúa como el resto de unión. Las toxinas bacterianas que ribosilan ADP preferidas para su uso en las composiciones de la presente invención incluyen toxina del cólera y las toxinas lábiles por calor de *E. coli*.

La toxina del cólera (CT) y las enterotoxinas lábiles por calor de *E. coli* (LT) son productos de secreción de sus cepas bacterianas enterotóxicas respectivas que son potentes inmunógenos y muestran fuerte toxicidad cuando se administran por vía sistémica, vía oral o vía mucosa. Se sabe que tanto CT como LT proporcionan efectos adyuvantes para antígenos cuando se administran mediante las vías intramuscular u oral. Estos efectos adyuvantes se han observado a dosis por debajo de la requerida para toxicidad. Las dos toxinas son moléculas extremadamente similares y son al menos aproximadamente 70-80 % homólogas en el nivel de aminoácidos.

Preferentemente el adyuvante genético es toxina del cólera (CT), toxina lábil por calor de *E. coli* enterotoxigénica (LT) o un derivado, subunidad o fragmento de CT o LT que conserva la adyuvancia. En una realización más preferida, el adyuvante genético es LT. En otra realización preferida, el adyuvante genético puede ser CTB o LTB.

Preferentemente la enterotoxina es una enterotoxina no tóxica.

El uso de toxinas que ribosilan ADP detoxificadas como coadyuvantes de mucosa se describe en el documento WO 95/17211 y como coadyuvantes parenterales en el documento WO 98/42375. La toxina o toxoide está preferentemente en forma de una holotoxina, que comprende subunidades tanto A como B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación detoxificante; preferentemente la subunidad B no está mutada. Preferentemente, el adyuvante es un mutante LT detoxificado tal como LT-K63, LT-R72 y LTR192G. El uso de toxinas que ribosilan ADP y derivados detoxificados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede hallarse en las siguientes referencias (Beignon, y col. Infection and Immunity (2002) 70(6):3012 - 3019; Pizza, y col., Vaccine (2001) 19:2534 - 2541; Pizza, y col., Int. J. Med. Microbiol (2000) 290(4-5):455-461; Scharton-Kersten y col. Infection and Immunity (2000) 6S(9):5306- 5313; Ryan y col. Infection and Immunity (1999) 67(12):6270 - 6280; Partidos y col. Immunol. Lett. (1999) 67(3):209 -216; Peppoloni y col. Vaccines (2003) 2(2):285-293; y Pine y col. J. Control Release (2002) 85(1-3):263-270). La referencia numérica para sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de toxinas que ribosilan ADP expuestos en Domenighini y col., Mol. Microbiol (1995) 15(6):1166-167.

Como ejemplo adicional, al menos una de las regiones codificantes de subunidad de enterotoxina puede modificarse genéticamente para detoxificar el péptido subunitario codificado por las mismas, por ejemplo en el que la región que codifica la subunidad A truncada se ha modificado genéticamente para interrumpir o inactivar la actividad ADP-ribosil transferasa en el producto de expresión del péptido subunitario (véase, por ejemplo, el documento WO 03/004055).

Por lo tanto, estos resultados demuestran que este adyuvante genético es particularmente deseable cuando se desea una respuesta de CMI aún más potenciada. Otros adyuvantes genéticos deseables incluyen pero sin limitación secuencias de nucleótidos que codifican IL-10, IL-12, IL-13, los interferones (IFN) (por ejemplo, IFN-alfa, IFN-ss e IFN-gamma) y combinaciones preferidas de las mismas. Otros factores biológicamente activos tales que potencian la respuesta de CMI pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la materia y un vector plasmídico adecuado que los contiene puede construirse por técnicas conocidas.

Por tanto, las composiciones (por ejemplo, vacunas) de la invención pueden administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores. En particular, las composiciones habitualmente incluirán un adyuvante. Los adyuvantes para su uso con la invención incluyen, pero sin limitación, uno o más de los expuestos a continuación:

A. Composiciones que contienen minerales

Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como coadyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. (por

ejemplo, véanse capítulos 8 y 9 de Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum), o mezclas de compuestos minerales diferentes (por ejemplo, una mezcla de un fosfato y un adyuvante de hidróxido, opcionalmente con un exceso del fosfato), tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y prefiriéndose adsorción a la sal o sales. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica (documento WO00/23105).

Pueden incluirse sales de aluminio en vacunas de la invención de modo que la dosis de Al^{3+} esté entre 0,2 y 1,0 mg por dosis.

B. Emulsiones de aceite

Las composiciones de emulsión en aceite para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (escualeno 5 %, Tween 80, 0,5 % y Span 85 0,5 %, formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidificador). Véase el documento WO90/14837. Véase también, Podda, "The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine", Vaccine (2001) 19: 2673-2680; Frey y col., "Comparison of the safety, tolerability, and immunogenicity of a MF59-adjuvanted influenza vaccine and a non-adjuvanted influenza vaccine in non-elderly adults", Vaccine (2003) 21:4234-4237. Se usa MF59 como el adyuvante en la vacuna subunitaria trivalente de virus de la gripe FLUAD™.

Son adyuvantes particularmente preferidos para su uso en las composiciones emulsiones de aceite en agua submicrométricas. Son emulsiones de aceite en agua submicrométricas preferidas para su uso en el presente documento emulsiones de escualeno/agua que opcionalmente contienen diversas cantidades de MTP-PE, tales como una emulsión de aceite en agua submicrométrica que contiene escualeno 4-5 % p/v, Tween 80™ 0,25-1,0 % p/v (polioxietilensorbitán monooleato) y/o Span 85™ (sorbitán trioleato) 0,2-1,0 % y, opcionalmente, N-acetil-muramyl-L-alanyl-D-iso-glutaminil-L-alanine-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), por ejemplo, la emulsión de aceite en agua submicrométrica conocida como "MF59" (Publicación Internacional N° WO90/14837; Patentes de Estados Unidos N° 6.299.884 y 6.451.325 y Ott y col., "MF59 - Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines" en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell, M.F. and Newman, M.J. eds.) Plenum Press, Nueva York, 1995, páginas 277-296). MF59 contiene escualeno 4-5 % p/v (por ejemplo, 4,3 %), Tween 80™ 0,25-0,5 % p/v y Span 85™ 0,5 % p/v y opcionalmente contiene diversas cantidades de MTP-PE, formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidificador tal como microfluidificador modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA). Por ejemplo, MTP-PE puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0-500 µg/dosis, más preferentemente 0-250 µg/dosis y más preferentemente, 0-100 µg/dosis. Como se usa en el presente documento, el término "MF59-0" se refiere a la anterior emulsión de aceite en agua submicrométrica sin MTP-PE, mientras que el término MF59-MTP indica una formulación que contiene MTP-PE. Por ejemplo, "MF59-100" contiene 100 µg de MTP-PE por dosis, y así sucesivamente. MF69, otra emulsión de aceite en agua submicrométrica para su uso en el presente documento, contiene escualeno 4,3 % p/v, Tween 80™ 0,25 % p/v y Span 85™ 0,75 % p/v y opcionalmente MTP-PE. Otra emulsión de aceite en agua submicrométrica más es MF75, también conocida como SAF, que contiene escualeno 10 %, Tween 80™ 0,4 %, polímero L121 bloqueado con pluronic 5 % y thr-MDP, también microfluidificada en una emulsión submicrométrica. MF75-MTP indica una formulación de MF75 que incluye MTP, tal como de 100 a 400 µg de MTP-PE por dosis.

Se describen emulsiones de aceite en agua submicrométricas, procedimientos para preparar las mismas y agentes inmunoestimuladores, tales como péptidos de muramilo, para su uso en las composiciones, en detalle en la Publicación Internacional N° WO90/14837 y Patentes de Estados Unidos N° 6.299.884 y 6.451.325.

También puede usarse adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA) como adyuvantes en la invención.

C. Formulaciones de saponina

También pueden usarse formulaciones de saponina como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esteroles y glucósidos de triterpenoide que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia serie de especies vegetales. La saponina de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina se ha estudiado ampliamente como coadyuvante. La Saponina también puede obtenerse en el mercado de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia), y *Saponaria officinalis* (jabonera). Las formulaciones de adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como ISCOM.

Se han purificado composiciones de saponina usando cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HP-LC) y cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC). Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas, que incluyen QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Se desvela un procedimiento de producción de QS21 en la Patente de Estados Unidos N° 5.057.540. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroles, tal como colesterol (véase, el documento WO96/33739).

Pueden usarse combinaciones de saponinas y colesterol para formar partículas únicas llamadas complejos

inmunoestimuladores (ISCOM). Los ISCOM típicamente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede usarse cualquier saponina conocida en ISCOM. Preferentemente, los ISCOM incluyen uno o más de Quil A, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en los documentos EP0109942, WO96/11711 y WO96/33739. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional. Véase documento WO00/07621.

Puede encontrarse una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina en Barr, y col., "ISCOMs and other saponin based adjuvants", *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) 32:247-271. Véase también Sjolander, y col., "Uptake and adjuvant activity of orally delivered saponin and ISCOM vaccines", *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) 32: 321-338.

D. Virosomas y partículas de tipo viral (VLP)

También pueden usarse virosomas y partículas de tipo viral (VLP) como coadyuvantes en la invención. Estas estructuras generalmente contienen una o más proteínas de un virus opcionalmente combinadas o formuladas con un fosfolípido. Generalmente son no patogénicas, no replicativas y generalmente no contienen ningún genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden producirse de forma recombinante o aislarse de virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para su uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas de virus de la gripe (tales como HA o NA), virus de hepatitis B (tales como proteínas de la cápsida o del núcleo), virus de hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de glosopeda, retrovirus, virus Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tal como proteínas de revestimiento), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como proteína de retrotransposón Ty pl). Las VLP se analizan adicionalmente en los documentos WO03/024480, WO03/024481, y Niikura y col., "Chimeric Recombinant Hepatitis E Virus-Like Particles as an Oral Vaccine Vehicle Presenting Foreign Epitopes", *Virology* (2002) 293:273-280; Lenz y col., "Papillomavirus-Like Particles Induce Acute Activation of Dendritic Cells", *Journal of Immunology* (2001) 5246-5355; Pinto, y col., "Cellular Immune Responses to Human Papillomavirus (HPV)-16 L1 Healthy Volunteers Immunized with Recombinant HBV-16 L1 Virus-Like Particles", *Journal of Infectious Diseases* (2003) 188:327-338; y Gerber y col., "Human Papillomavirus Virus-Like Particles Are Efficient Oral Immunogens when Coadministered with Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin Mutant R192G or CpG", *Journal of Virology* (2001) 75(10): 4752-4760. Se analizan adicionalmente virosomas en, por ejemplo, Gluck y col., "New Technology Platforms in the Development of Vaccines for the Future", *Vaccine* (2002) 20:B10 -B16. Se usa la inmunopotenciación de virosomas de la gripe reconstituidos (IRIV) como el sistema de suministro de antígenos subunitarios en el producto trivalente intranasal INFLEXAL™ {Mischler & Metcalfe (2002) *Vaccine* 20 Supl. 5:B17-23} y el producto INFLUVAC PLUS™.

E. Derivados bacterianos o microbianos

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como:

(1) Derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS)

Tales derivados incluyen Monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3-O-desacilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma de "partícula pequeña" preferida de monofosforil lípido A 3-O-desacilado se desvela en el documento EP 0 689 454. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son suficientemente pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros (véase documento EP 0.689 454). Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A, tales como derivados de fosfato de aminoalquil glucosaminida por ejemplo RC-529. Véase Johnson y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.

(2) Derivados de lípido A

Los derivados de lípido A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. OM-174 se describe por ejemplo en Meraldi y col., "OM-174, a New Adjuvant with a Potential for Human Use, Induces a Protective Response with Administered with the Synthetic C-Terminal Fragment 242-310 from the circumsporozoite protein of Plasmodium Berghei", *Vaccine* (2003) 21:2485-2491; y Pajak, y col., "The Adjuvant OM-174 induces both the migration and maturation of murine dendritic cells *in vivo*", *Vaccine* (2003) 21:836-842.

(3) Oligonucleótidos inmunoestimuladores

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia que contiene una citosina no metilada seguida de guanosina y unida por un enlace fosfato). También se ha mostrado que los oligonucleótidos o ARN bicatenario bacteriano que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) son inmunoestimuladores.

Los CpG pueden incluir modificaciones de nucleótidos/análogos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Opcionalmente, la guanosina puede reemplazarse con un análogo tal como 2'-desoxi-7-desazaguanosina. Véase Kandimalla, y col., "Divergent synthetic nucleotide motif recognition pattern: design and development of potent immunomodulatory oligodeoxynucleotide agents with distinct cytokine induction profiles", *Nucleic Acids Research* (2003) 31(9): 2393-2400; documentos WO02/26757 y WO99/62923 para

ejemplos de posibles sustituciones de análogos. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos de CpG se analiza adicionalmente en Krieg, "CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?", *Nature Medicine* (2003) 9(7): 831-835; McCluskie, y col., "Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA", *FEMS Immunology and Medical Microbiology* (2002) 32:179-185; documento WO98/40100; Patente de Estados Unidos N° 6.207.646; Patente de Estados Unidos N° 6.239.116 y Patente de Estados Unidos N° 6.429.199.

La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT. Véase Kandimalla, y col., "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs", *Biochemical Society Transactions* (2003) 31 (parte 3): 654-658. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune de Th1, tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B, tal como un ODN CpG-B. Los ODN CpG-A CpG-B se analizan en Blackwell, y col., "CpG-A-Induced Monocyte IFN-gamma-Inducible Protein-10 Production is Regulated by Plasmacytoid Dendritic Cell Derived IFN-alpha", *J. Immunol.* (2003) 170(8):4061-4068; Krieg, "From A to Z on CpG", *TRENDS in Immunology* (2002) 23(2): 64-65 y documento WO01/95935. Preferentemente, el CpG es un ODN CpG-A.

Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de modo que el extremo 5' sea accesible para reconocimiento del receptor. Opcionalmente, pueden unirse dos secuencias oligonucleotídicas de CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véase, por ejemplo, Kandimalla, y col., "Secondary structures in CpG oligonucleotides affect immunostimulatory activity", *BBRC* (2003) 306: 948-953; Kandimalla, y col., "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs", *Biochemical Society Transactions* (2003) 31(parte 3):664-658; Bhagat y col., "CpG penta- and hexadeoxyribonucleotides as potent immunomodulatory agents" *BBRC* (2003) 300:853-861 y documento WO03/035836.

(4) *Toxinas que ribosilan ADP y derivados detoxificados de las mismas.*

Como se ha descrito anteriormente, pueden usarse toxinas que ribosilan ADP bacterianas y derivados detoxificados de las mismas como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína deriva de *E. coli* (es decir, enterotoxina lábil por calor de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") o pertussis ("PT"). El uso de toxinas que ribosilan ADP detoxificadas como adyuvantes de mucosa se describe en el documento WO95/17211 y como adyuvantes parenterales en el documento WO98/42375. Preferentemente, el adyuvante es un mutante de LT detoxificada tal como LT-K63, LT-R72 y LTR192G. El uso de toxinas que ribosilan ADP y derivados detoxificados de las mismas, particularmente LTK63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en las siguientes referencias: Beignon, y col., "The LTR72 Mutant of Heat-Labile Enterotoxin of *Escherichia coli* Enhances the Ability of Peptide Antigens to Elicit CD4+ T Cells and Secrete Gamma Interferon after Coapplication onto Bare Skin", *Infection and Immunity* (2002) 70(6):3012-3019; Pizza, y col., "Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants", *Vaccine* (2001) 19:2534-2541; Pizza, y col., "LTK63 and LTR72, two mucosal adjuvants ready for clinical trials" *Int. J. Med. Microbiol* (2000) 290(4-5):455-461; Scharton- Kersten y col., "Transcutaneous Immunization with Bacterial ADP-Ribosylating Exotoxins, Subunits and Unrelated Adjuvants", *Infection and Immunity* (2000) 68(9):5306-5313; Ryan y col., "Mutants of *Escherichia coli* Heat-Labile Toxin Act as Effective Mucosal Adjuvants for Nasal Delivery of an Acellular Pertussis Vaccine: Differential Effects of the Nontoxic AB Complex and Enzyme Activity on Th1 and Th2 Cells" *Infection and Immunity* (1999) 67(12):6270-6280; Partidos y col., "Heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* and its site-directed mutant LTK63 enhance the proliferative and cytotoxic T-cell responses to intranasally co-immunized synthetic peptides", *Immunol. Lett.* (1999) 67(3):209-216; Peppoloni y col., "Mutants of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as safe and strong adjuvants for intranasal delivery of vaccines", *Vaccines* (2003) 2(2):285-293; y Pine y col., (2002) "Intranasal immunization with influenza vaccine and a detoxified mutant of heat labile enterotoxin from *Escherichia coli* (LTK63)" *J. Control Release* (2002) 85 (1-3):263-270. La referencia numérica para sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de toxinas que ribosilan ADP expuestos en Domenighini y col., *Mol. Microbiol* (1995) 15(6):1165-1167.

F. Bioadhesivos y mucoadhesivos

También pueden usarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes en la invención. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas (Singh y col. (2001) J. Cont. Rele. 70:267-276) o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de ácido poli(acrílico), alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También pueden usarse quitosano y derivados del mismo como adyuvantes de la invención. Por ejemplo, documento WO99/27960.

G. Micropartículas

También pueden usarse micropartículas como adyuvantes en la invención. Se prefieren micropartículas (es decir una partícula de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 150 μ m de diámetro, más preferentemente de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 30 μ m de diámetro y más preferentemente de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 10 μ m de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo un ácido poli(α -hidroxi), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.) con poli(lactida-co-glicolida), opcionalmente tratados para tener una superficie cargada negativamente (por ejemplo con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo con un detergente catiónico, tal como CTAB).

H. Liposomas

Los ejemplos de formulaciones de liposomas adecuados para su uso como adyuvantes se describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.090.406, Patente de Estados Unidos N° 5.916.588 y documento EP 0 626 169.

1. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno. Documento WO99/52549. Tales formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de polioxietileno sorbitán éster en combinación con un octoxinol (documento WO01/21207) así como tensioactivos de polioxietileno alquil éteres o ésteres en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (documento WO01/21152).

Se seleccionan éteres de polioxietileno preferidos del siguiente grupo: polioxietileno-9-lauril éter (laureth 9), polioxietileno-9-esteoril éter, polioxietileno-8-esteoril éter, polioxietileno-4-lauril éter, polioxietileno-35-lauril éter y polioxietileno-23-lauril éter.

J. Polifosfaceno (PCPP)

Se describen formulaciones de PCPP, por ejemplo, en Andrianov y col., "Preparation of hydrogel microspheres by coacervation of aqueous polyphosphazene solutions", Biomaterials (1998) 19(1-3):109-115 y Payne y col., "Protein Release from Polyphosphazene Matrices", Adv. Drug. Delivery Review (1998) 31(3):185-196.

K. Péptidos de muramilo

Los ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramilo-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramilo-1-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramilo-1-alanil-D-isoglutaminil-1-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina MTP-PE).

L. Compuestos de imidazoquinolona

Los ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen Imiquimod y sus homólogos, descritos adicionalmente en Stanley, "Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential" Clin Exp Dermatol (2002) 27(7):571-577 y Jones, "Resiquimod 3M", Curr Opin Investig Drugs (2003) 4(2):214-218.

La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, pueden usarse las siguientes composiciones de adyuvantes en la invención:

- (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua (documento WO99/112)
- (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) (véase documento WO94/00153);
- (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) + un colesterol;
- (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) (documento WO98/57659);
- (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua (véanse Solicitudes de Patente Europea 0835318, 0735898 y 0761231);
- (6) SAF, que contiene escualeno 10 %, Tween 80 0,4 %, polímero de bloque de pluronic L121 5 %, y thr-MDP, microfluidificados en una emulsión submicrométrica o agitados en vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partículas;

(7) sistema de adyuvante de RibitTM (RAS), (Ribit Immunochem) que contiene escualeno 2 %, Tween 80 0,2 %, y uno o más componentes de pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforolípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (DetoxTM);

(8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dPML); y/o

(9) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un oligonucleótido inmunoestimulador (tal como una secuencia de nucleótidos que incluye un motivo CpG).

M. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen citocina, tal como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo, interferón- γ), factor estimulador de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

Son adyuvantes preferidos las sales de aluminio y MF59 para su uso con vacunas de gripe inyectables. Son adyuvantes preferidos las toxinas bacterianas y bioadhesivos para su uso con vacunas de suministro por vía mucosa, tales como vacunas nasales.

Preferentemente las composiciones de la presente invención se administran con alumbre y/o secuencias de CpG.

FORMULACIONES

Las composiciones de la invención pueden prepararse de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, tales como soluciones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección (por ejemplo, una composición liofilizada). La composición puede prepararse para administración tópica por ejemplo como una pomada, crema o polvo. La composición puede prepararse para administración oral por ejemplo como un comprimido o cápsula, como una pulverización o como un jarabe (opcionalmente con sabores). La composición puede prepararse para administración pulmonar por ejemplo como un inhalador, usando un polvo fino o un pulverizador. La composición puede prepararse como un supositorio o pesario. La composición puede prepararse para administración nasal, ótica u ocular por ejemplo como gotas. La composición puede estar en forma de kit, diseñado de modo que se reconstituye una composición combinada justo antes de su administración a un paciente. Tales kits pueden comprender uno o más antígenos en forma líquida y uno o más antígenos liofilizados.

Las composiciones de la invención son preferentemente composiciones inmunogénicas y son más preferentemente composiciones de vacuna. El pH de la composición está preferentemente entre 6 y 8, preferentemente aproximadamente 7. El pH puede mantenerse mediante el uso de un tampón. La composición puede ser estéril y/o sin pirógenos. La composición puede ser isotónica con respecto a seres humanos.

Preferentemente la composición de bARE comprende uno o más antígenos.

Un "antígeno" se refiere a cualquier agente, generalmente una macromolécula, que puede inducir una respuesta inmunológica en un individuo. El término puede usarse para referirse a una macromolécula individual o a una población homogénea o heterogénea de macromoléculas antigénicas. Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se usa generalmente para referirse a una molécula proteica o parte de la misma que comprende uno o más epítomos. Para fines de la presente invención, pueden obtenerse o derivarse antígenos de cualquier virus, bacteria, parásito o patógeno fúngico conocido. El término también incluye cualquiera de los diversos antígenos específicos de tumor y antígenos asociados con enfermedades autoinmunes.

Además, para fines de la presente invención, un "antígeno" incluye una proteína que tiene modificaciones, tal como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa) a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga suficiente inmunogenicidad. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo a través de mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de los huéspedes que producen los antígenos.

En diversos aspectos de la invención, el antígeno contiene uno o más epítomos de linfocitos T. Un "epítomo de linfocitos T" se refiere generalmente a las características de una estructura peptídica que son capaces de inducir una respuesta de linfocitos T. A este respecto, se acepta en la técnica que los epítomos de linfocitos T comprenden determinantes peptídicos lineales que toman conformaciones extendidas dentro de la hendidura de unión a péptido de las moléculas del MHC, (Unanue y col. (1987) Science 236: 551-557). Como se usa en el presente documento, un epítomo de linfocitos T es generalmente un péptido que tiene al menos aproximadamente 3-5 restos aminoácidos y preferentemente al menos 5-10 o más restos aminoácidos. La capacidad de un antígeno particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse por varios ensayos bien conocidos, tales como por ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, o ensayando con respecto a linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado. Véase, por ejemplo, Erickson y col. (1993) J. Immunol. 151: 4189-4199; y Doe y col. (1994) Eur. J. Immunol. 24: 2369-2376.

En otros aspectos de la invención, el antígeno contiene uno o más epítomos de linfocitos B. Un "epítomo de linfocitos

B" generalmente se refiere al sitio en un antígeno al que se une una molécula de anticuerpo específica. La identificación de epítomos que son capaces de inducir una respuesta de anticuerpos se consigue fácilmente usando técnicas bien conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, Geysen y col. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 3998-4002 (procedimiento general para sintetizar rápidamente péptidos para determinar la localización de epítomos inmunogénicos en un antígeno dado); Patente de Estados Unidos N° 4.708.871 (procedimientos para identificar y sintetizar químicamente epítomos de antígenos); y Geysen y col. (1986) *Molecular Immunology* 23: 709-715 (técnica para identificar péptidos con alta afinidad por un anticuerpo dado.)

El antígeno de interés, se asociará preferentemente con un patógeno tal como un patógeno viral, bacteriano o parasítico, o el antígeno puede ser un antígeno específico de tumor. El antígeno puede ser una proteína de longitud completa. Como alternativa, el antígeno puede consistir esencialmente solo en un epítomo de linfocitos B o un epítomo de linfocitos T de un antígeno.

Los antígenos específicos de tumor incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los diversos MAGE (antígeno E asociado con melanoma), incluyendo MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3 (péptido HLA-A1), MAGE 4, etc.; cualquiera de las diversas tirosinasas (péptido HLA-A2); ras mutante; p53 mutante; y antígeno de melanoma p97. Otros antígenos específicos de tumor incluyen el péptido Ras y péptido p53 asociados con cánceres avanzados, los antígenos 16/18 y E6/E7 de VPH asociados con cánceres cervicales, antígeno MUC1-KLH asociado con carcinoma de mama, CEA (antígeno carcinoembrionario) asociado con cáncer colorrectal, antígenos gp100 o MART1 asociados con melanoma y el antígeno de PSA asociado con cáncer de próstata. La secuencia del gen p53 se conoce (véase por ejemplo, Harris y col. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 4650-4656) y está depositada con el N° de Acceso de GenBank M14694.

Los antígenos virales adecuados incluyen, pero sin limitación, secuencias polinucleotídicas que codifican antígenos de la familia de virus de la gripe (véase por ejemplo, la base de datos de secuencia de la gripe en <http://www.flu.lanl.gov/review/annual.html>), de la familia de virus de la hepatitis, incluyendo virus de la hepatitis A (VHA), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis delta (VHD), virus de la hepatitis E (VHE) y virus de la hepatitis G (VHG). Como ejemplo, se conoce la secuencia genómica viral de VHB, así como procedimientos para obtener secuencias que codifican antígenos de la misma. Véase, por ejemplo, Ganem y col. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* 56: 651-693; Hollinger, F. B. (1990) *Hepatitis B virus*, vol. II, pp. 217-2235, in Fields y col. (eds), *Virology*, 2ª ed, Raven Press, Nueva York, NY; y Valenzuela y col. (1980) *The nucleotide Sequence of the Hepatitis B viral Genome and the Identification of the Major Viral Genes*, pp. 57-70, en Fields y col. (eds), *Animal Virus Genetics*, Academic Press, Nueva York, NY). El genoma de VHB codifica varias proteínas virales, incluyendo los polipéptidos antigénicos de superficie grande, medio y principal, el polipéptido del gen X y el polipéptido del núcleo. Véase, por ejemplo, Yokosuka y col. (1986) *N. Engl. J. Med.* 315: 1187-1192; Imazeki y col. (1987) *Hepatology* 7: 753-757; Kaneko y col. (1988) *J. Virol.* 62: 3979-3984; y Ou y col. (1990) *J. Virol.* 64: 4578-4581. De manera similar, la secuencia genómica viral de VHC se conoce, así como métodos para obtener la secuencia. Véase, por ejemplo, Publicaciones Internacionales N° WO89/04669; WO90/11089; y WO 90/14436. El genoma de VHC codifica varias proteínas virales, incluyendo EI y E2. Véase, por ejemplo, Houghton y col. (1991) *Hepatology* 14: 381-388. Las secuencias que codifican estas proteínas de VHB y VHC, así como fragmentos antigénicos de las mismas, encuentran uso en los presentes procedimientos. De forma similar, la secuencia codificante para el antígeno 8 de VHD se conoce (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.378.814).

De manera similar, pueden usarse secuencias que codifican una amplia diversidad de antígenos proteicos de la familia de herpes virus en la presente invención, incluyendo antígenos derivados de virus del herpes simple (VHS) tipos 1 y 2, tales como glucoproteínas de VHS-1 y VHS-2 gB, gD y gH, antígenos de virus de la varicela zoster (VVZ), virus de Epstein Barr (VEB) y citomegalovirus (CMV) incluyendo gB y gH de CMV; y antígenos de otros virus de herpes humanos tales como VHH6 y VHH7. (Véase, por ejemplo, Chee y col. (1990) *Cytomegaloviruses* (J. K. McDougall, ed., Springer-Verlag, pp. 125169; McGeoch y col. (1988) *J. Gen. Virol.* 69: 1531-1574; Patente de Estados Unidos N° 5.171.568; Baer y col. (1984) *Nature* 310: 207-211; y Davison y col. (1986) *J. Gen. Virol.* 67:1759-1816). Se conocen antígenos de VIH, tales como las secuencias de gp120 para una multitud de aislados de VIH-1 y VIH-2, incluyendo miembros de los diversos subtipos genéticos de VIH, y se han presentado (véase, por ejemplo, Myers y col., *Los Alamos Database*, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, Nuevo México (1992); y Modrow y col. (1987) *J. Virol.* 61: 570-578) y los antígenos derivados de cualquiera de estos aislados encontrarán uso en los presentes procedimientos.

Además, la invención se puede aplicar igualmente a otros restos inmunogénicos derivados de cualquiera de los diversos aislados de VIH, incluyendo cualquiera de las diversas proteínas de envoltura de Reoviridae; Birnaviridae; Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la rabia, etc.); Filoviridae; Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio, etc.); Bunyaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (por ejemplo, HTLV-I; HTLV-11; VIH-1 (también conocido como HTLV-III, LAV, ARV, hTLR, etc.)), incluyendo pero sin limitación antígenos de los VIH aislados (VIH, VIHv, VIH-, VIH-); VIH-1" VIH-1, VIH-2, entre otros. Véase, por ejemplo, *Virology*, 3ª Edición (W. K. Joklik ed. 1988); *Fundamental Virology*, 2ª Edición (B. N. Fields y D. M. Knipe, eds. 1991), para una descripción de estos y otros virus.

Se obtienen secuencias que codifican antígenos parasitarios y bacterianos adecuados o se derivan de agentes causantes conocidos responsables de enfermedades tales como Difteria, Pertussis, Tétanos, Tuberculosis, Neumonía Bacteriana o Fúngica, Cólera, Fiebre Tifoidea, Peste, Sigelosis o Salmonelosis, Enfermedad del

Legionario, Enfermedad de Lyme, Lepra, Malaria, *Ancylostomea duodenale*, Oncocercosis, Esquistosomiasis, Tripanosomiasis, Leishmaniasis, Giardiasis, Amebiasis, Filariasis, Borelia y Triquinosis. Pueden obtenerse más antígenos adicionales o derivarse de virus no convencionales o agentes de tipo viral tales como los agentes causantes de kuru, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), tembladera, encefalopatía transmisible del visón, y enfermedades de debilitamiento crónico o de partículas infecciosas proteínicas tales como priones que se asocian con la enfermedad de las vacas locas.

Tanto la secuencia para el promotor mínimo como la secuencia codificante de interés pueden obtenerse y/o prepararse usando procedimientos conocidos. Por ejemplo, pueden obtenerse preparaciones antigénicas sustancialmente puras usando herramientas biológicas moleculares convencionales. Es decir, pueden obtenerse secuencias polinucleotídicas que codifican los antígenos anteriormente descritos usando procedimientos recombinantes, tales como por exploración de ADNc y bibliotecas genómicas de células que expresan el gen, o derivando el gen de un vector que se sabe que incluye a las mismas. Además, el gen deseado o secuencia promotora pueden aislarse directamente de células y tejidos que los contienen, usando técnicas convencionales, tales como extracción de fenol y PCR de ADNc o ADN genómico. Véase, por ejemplo Sambrook y col., mencionado anteriormente, para una descripción de técnicas usadas para obtener y aislar ADN. También pueden producirse secuencias polinucleotídicas de forma sintética, en lugar de clonarse.

Otro procedimiento conveniente más para aislar moléculas de ácido nucleico específicas es por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mullis y col. (1987) Methods Enzymol. 155: 335-350. Esta técnica usa ADN polimerasa, habitualmente una ADN polimerasa termoestable, para replicar una región deseada de ADN. La región de ADN a replicar se identifica por oligonucleótidos de secuencia específica complementaria a extremos opuestos y cadenas opuestas del ADN deseado para cebar la reacción de replicación. El producto del primer ciclo de replicación es en sí mismo un molde para la replicación posterior, de modo que ciclos sucesivos repetidos de replicación dan como resultado una amplificación geométrica del fragmento de ADN delimitado por el par de cebadores usado.

Los antígenos en la composición típicamente estarán presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para inducir una respuesta inmune contra ese antígeno. Como alternativa a usar antígenos proteicos en la composición de la invención, puede usarse ácido nucleico que codifique el antígeno. Robinson & Torres (1997) Seminars in Immunology 9: 271-283; Donnelly y col. (1997) Annu Rev Immunol 15: 617-648; Scott-Taylor & Dalgleish (2000) Expert Opin Investig Drugs 9: 471-480; Apostolopoulos & Plebanski (2000) Curr Opin Mol Ther 2: 441-447; Ilan (1999) Curr Opin Mol Ther 1: 116-120; Dubensky y col. (2000) Mol Med 6: 723-732; Robinson & Pertmer (2000) Adv Virus Res 55: 1-74; Donnelly y col. (2000) Am J Respir Crit Care Med 162(4 Pt 2): S190-193 y Davis (1999) Mt. Sinai J. Med. 66: 84-90. Los componentes proteicos de las composiciones de la invención pueden por lo tanto reemplazarse por ácido nucleico (preferentemente ADN, por ejemplo, en forma de un plásmido) que codifica la proteína.

Las composiciones de la presente invención se preparan preferentemente premezclando los agentes estabilizadores y tamponantes, y cualquier otro excipiente antes de la incorporación del polipéptido de interés. Cualquier excipiente adicional que puede añadirse para estabilizar adicionalmente las composiciones de la presente invención no debe afectar de forma adversa a los efectos estabilizadores del agente de estabilización primario, es decir, una base aminoacídica, en combinación con el agente tamponante, es decir, un ácido sustancialmente sin su forma de sal, la forma de sal del ácido o una mezcla del ácido y su forma de sal, como se usa para obtener las composiciones nuevas desveladas en el presente documento. Después de la adición de una cantidad preferida de una base aminoacídica para conseguir una reducción de la formación de agregados de un polipéptido de interés, se ajusta el pH de la composición líquida usando el agente tamponante, preferentemente dentro de un intervalo desvelado en el presente documento, más preferentemente al pH óptimo para el polipéptido de interés. Aunque el pH puede ajustarse después de la adición del polipéptido de interés a la composición, preferentemente se ajusta antes de la adición de este polipéptido, puesto que este puede reducir el riesgo de desnaturalización del polipéptido.

Se usan después dispositivos mecánicos apropiados para conseguir una mezcla apropiada de constituyentes.

Las composiciones de bARE de la presente invención abarcan composiciones líquidas y formas secas de las mismas. Para los fines de la presente invención, el término "líquido" con respecto a composiciones o formulaciones farmacéuticas pretende incluir el término "acuoso" e incluye formulaciones líquidas que están congeladas. Por "forma seca" se entiende que la composición o formulación farmacéutica líquida se seca por secado por congelación (es decir, liofilización; véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38: 48-59), secado por pulverización (véase Masters (1991) en Spray-Drying Handbook (5ª ed; Longman Scientific and Technical, Essex, Reino Unido), pp. 491-676; Broadhead y col. (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18: 1169-1206; y Mumenthaler et al. (1994) Pharm. Res. 11: 12-20), o secado al aire (Carpenter y Crowe (1988) Cryobiology 25: 459-470; y Roser (1991) Biopharm. 4: 47-53).

Por "acuoso" se entiende una composición preparada con, que contiene, o disuelta en agua, incluyendo mezclas en las que el agua es la sustancia predominante en la mezcla. Una sustancia predominante está presente en una mayor cantidad que otro componente de la mezcla. Por "no acuoso" se entiende una composición preparada con, que contiene, o disuelta en una sustancia distinta de agua o mezclas en las que el agua no es la sustancia predominante en la mezcla. Por "solución" se entiende una preparación homogénea de dos o más sustancias que

puede ser sólidos, líquidos, gases o intercombinaciones de las mismas.

El término “lío­filizar” con respecto a formulaciones de proteína bARE pretende referirse a liofilización rápida bajo presión reducida de una pluralidad de frascos, conteniendo cada uno una dosis unitaria de la formulación de proteína bARE de la presente invención en los mismos. Están disponibles en el mercado liofilizadores, que realizan la liofilización anteriormente descrita, y son fácilmente manejables por los expertos en la materia. En una realización de la presente invención, la composición líquida se prepara como una composición liofilizada.

Las composiciones de proteína bARE de la presente invención son composiciones “estabilizadas”. Por “estabilizadas” se entiende que las composiciones conservan su polipéptido bARE en su estado sustancialmente multimérico durante el almacenamiento y por lo tanto la eficacia terapéutica de este polipéptido bARE no se ve comprometida debido a la formación de agregado o disociación en formas subunitarias. Por “durante el almacenamiento” se entiende que una composición o formulación una vez preparada, no se administra inmediatamente a un sujeto. En su lugar, después de la preparación, se envasa para almacenamiento, en una forma líquida, en un estado congelado o en una forma seca para reconstitución posterior en una forma líquida u otra forma adecuada para administración a un sujeto. Preferentemente, las composiciones de la invención se almacenan directamente en su forma líquida para aprovechar completamente la conveniencia de tener estabilidad de almacenamiento en la forma líquida, facilidad de administración sin reconstitución y capacidad de proporcionar la formulación en jeringas listas para usar precargadas o como preparaciones multidosis si la formulación es compatible con agentes bacteriostáticos. Las composiciones de bARE estabilizadas de la invención preferentemente tienen un periodo de caducidad de al menos aproximadamente 6 meses, 12 meses, 18 meses, más preferentemente al menos 20 meses, aún más preferentemente al menos aproximadamente 22 meses, más preferentemente al menos aproximadamente 24 meses cuando se almacena a 2-8 °C.

La composición estabilizada que comprende la proteína bARE puede formularse en una dosificación unitaria y puede estar en una forma inyectable o infundible tal como una solución. Además, puede almacenarse congelada o prepararse en la forma seca, tal como un polvo liofilizado, que puede reconstituirse en la solución líquida antes de la administración por cualquiera de los diversos procedimientos incluyendo vías orales o parenterales de administración.

Preferentemente se almacena en la formulación líquida para aprovechar la estabilidad de almacenamiento aumentada conseguida de acuerdo con los procedimientos de la presente invención como se describe posteriormente. La composición estabilizada se esteriliza preferentemente por filtración en membrana y se almacena en recipientes de dosis unitaria o multidosis tales como frascos sellados o ampollas. Pueden usarse procedimientos adicionales para formular una composición generalmente conocidos en la técnica para potenciar adicionalmente la estabilidad de almacenamiento de las composiciones líquidas desveladas en el presente documento siempre que no afecten de forma adversa a los efectos beneficiosos de los agentes tamponantes y de estabilización preferidos desvelados en los procedimientos de la invención. Puede encontrarse un análisis exhaustivo de formulación y selección de vehículos, estabilizadores, etc. farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) (18ª ed. Mack Pub. Co., Eaton, Pensilvania).

La composición de la invención comprenderá típicamente, además de los componentes mencionados anteriormente, uno o más “vehículos farmacéutica o inmunológicamente aceptables”, que incluye, por ejemplo, cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son típicamente macromoléculas grandes metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas). Tales vehículos se conocen bien por los expertos habituales en la materia. Las composiciones pueden contener también diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes de pH y similares. Está disponible un análisis exhaustivo de excipientes farmacéuticamente aceptables en Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª ed., ISBN: 0683306472.

Las proteínas bARE pueden formularse en una composición farmacéutica o una composición inmunoterapéutica o una composición de vacuna. Tales formulaciones comprenden moléculas biológicas, tales como una proteína bARE combinada con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o solución salina isotónica estéril. Tales formulaciones pueden prepararse, envasarse o venderse en una forma adecuada para administración de embolada o para administración continua. Las formulaciones inyectables pueden prepararse, envasarse o venderse en forma farmacéutica unitaria, tal como en ampollas o en recipientes multidosis que contienen un conservante. Las formulaciones incluyen, pero sin limitación, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas y formulaciones biodegradables o de liberación prolongada implantables. Tales formulaciones pueden comprender adicionalmente uno o más ingredientes adicionales incluyendo, pero sin limitación, agentes de suspensión, estabilización o dispersión. En una realización de una formulación para administración parenteral, el principio activo se proporciona en forma seca (por ejemplo, un polvo o gránulos) para reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril sin pirógenos) antes de administración parenteral de la composición reconstituida. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse, envasarse o venderse en forma de suspensión o solución acuosa u oleosa inestable estéril. Esta suspensión o solución puede formularse de acuerdo con la técnica

conocida y puede comprender, además del principio activo, ingredientes adicionales tales como los agentes de dispersión, agentes humectantes o agentes de suspensión descritos en el presente documento. Tales formulaciones insertables estériles pueden prepararse usando un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como agua o 1,3-butanodiol, por ejemplo. Otros diluyentes y disolventes aceptables incluyen, pero sin limitación, solución de Ringer, solución de cloruro sódico isotónica, y aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos. Otras formulaciones parenteralmente administrables que son útiles incluyen las que comprenden el principio activo en forma microcristalina, en una preparación liposomal, o como un componente de un sistema de polímeros biodegradables. Las composiciones para liberación prolongada o implantación pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero poco soluble o una sal poco soluble.

ADMINISTRACIÓN

Las composiciones de la invención generalmente se administrarán directamente a un paciente. Puede conseguirse el suministro directo por inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, vía intraperitoneal, vía intravenosa, vía intramuscular o en el espacio intersticial de un tejido) o por administración rectal, oral (por ejemplo, comprimido, pulverización), vaginal, tópica, transdérmica (por ejemplo véase documento WO99/27961) o transcutánea (por ejemplo documento WO02/074244 y documento WO02/064162), intranasal (por ejemplo, véase documento WO03/028760) ocular, ótica, pulmonar o mucosa de otro tipo. La invención puede usarse para inducir inmunidad sistémica y/o mucosa.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse solas o como parte de una composición, mediante una diversidad de vías diferentes. Ciertas vías pueden favorecerse para ciertas composiciones, dando como resultado la generación de una respuesta inmune más eficaz, preferentemente una respuesta inmune mediada por células (CMI), o siendo menos probable que induzcan efectos secundarios, o siendo más fáciles de administrar.

Como ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden administrarse mediante una vía sistémica, una vía mucosa o una vía transdérmica o pueden administrarse directamente a un tejido específico. Como se usa en el presente documento, la expresión "administración sistémica" incluye pero sin limitación cualquier vía parenteral de administración. En particular, la administración parenteral incluye, pero sin limitación, técnicas de inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intramuscular o intraesternal, de infusión dialítica de riñón, intravenosa o intraarterial. Preferentemente, la administración sistémica parenteral es inyección intramuscular.

En una realización preferida del procedimiento, las composiciones de la presente invención se administran mediante una vía transdérmica. A este respecto, y sin quedar ligado a la teoría, se cree que la administración transdérmica de una composición puede preferirse debido a que activa de forma más eficaz la rama inmune mediada por células (CMI) del sistema inmune.

El término suministro "transdérmico" se refiere a administración intradérmica (por ejemplo, en la dermis o epidermis), transdérmica (por ejemplo "percutánea") y transmucosa, es decir, suministro por pase de un agente a o a través de la piel o tejido mucoso. Véase, por ejemplo, *Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives*, Hadgraft y Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989); *Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications*, Robinson y Lee (eds.), Marcel Dekker Inc., (1987); y *Transdermal Delivery of Drugs*, Vols. 1-3, Kydonieus y Berner (eds.), CRC Press, (1987). Por lo tanto, el término abarca suministro de un agente usando un dispositivo de suministro de partículas (por ejemplo, una jeringa sin aguja) tal como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.630.796, así como suministro usando dispositivos de suministro mediados por partículas tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.865.796.

Como se usa en el presente documento, la expresión "administración mucosa" incluye pero sin limitación administración oral, intranasal, intravaginal, intrarrectal, intratraqueal, intestinal y oftálmica.

Se prefieren vías mucosas, particularmente intranasal, intratraqueal y oftálmica para proteger contra la exposición natural a patógenos ambientales tales como RSV, virus de la gripe y virus del resfriado o alérgenos tales como polen de hierba y ambrosía y ácaros del polvo.

La potenciación de la respuesta inmune, preferentemente la respuesta CMI potenciará el efecto protector contra un antígeno diana encontrado posteriormente tal como un alérgeno o agente microbiano.

En otra realización preferida de la presente invención, las composiciones de la presente invención pueden administrarse a células que se han aislado del sujeto huésped. En esta realización preferida, la composición se administra preferentemente a células presentadoras de antígenos profesionales (APC), tal como células dendríticas. Las APC pueden derivar de un sujeto huésped y modificarse *ex vivo* para expresar un antígeno de interés y después transferirse de nuevo al sujeto huésped para inducir una respuesta CMI potenciada. Se cree que las células dendríticas son las APC más potentes para estimular las respuestas CMI potenciadas porque los epítopos expresados del antígeno de interés deben adquirirse, procesarse y presentarse por APC profesionales a linfocitos T (linfocitos Th1 y Th2 auxiliares así como linfocitos T CD8+) para inducir una respuesta CMI potenciada.

ADMINISTRACIÓN DE PARTÍCULAS

Se conocen en la técnica procedimientos mediados por partículas para suministrar las composiciones de la presente invención. Por lo tanto, una vez preparados y purificados de forma adecuada, los antígenos anteriormente descritos o NOI que los codifican pueden recubrir partículas de vehículo centrales usando una diversidad de técnicas conocidas en la materia. Las partículas vehículo se seleccionan de materiales que tienen una densidad adecuada en el intervalo de tamaños de partículas típicamente usados para suministro intracelular desde un dispositivo de pistola génica. El tamaño de partícula vehículo óptimo dependerá, por supuesto del diámetro de las células diana.

Por "vehículo central" se entiende un vehículo que se recubre con un antígeno ajeno o ácido nucleico ajeno (por ejemplo, ADN, ARN) para transmitir un tamaño de partícula definido así como una densidad suficientemente alta para conseguir el impulso requerido para la penetración de membrana celular, de modo que la molécula ajena pueda suministrarse usando técnicas mediadas por partícula (véase, por ejemplo Patente de Estados Unidos 5.100.792). Los vehículos centrales típicamente incluyen materiales tales como tungsteno, oro, platino, ferrita, poliestireno y látex. Véase, por ejemplo, Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, (1994) Yang, N. ed., Oxford University Press, Nueva York, NY páginas 10-11. Se prefieren partículas de tungsteno y oro. Las partículas de tungsteno están fácilmente disponibles en tamaños medios de 0,5 a 2,0 micrómetros de diámetro. Las partículas de oro u oro microcristalino (por ejemplo, polvo de oro A1570, disponible de Engelhard Corp., East Newark, NJ) también encuentran uso con la presente invención. Las partículas de oro proporcionan uniformidad de tamaño (disponible de Alpha Chemicals en tamaños de partícula de 1-3 micrómetros, o disponible de Degussa, South Plainfield, NJ en un intervalo de tamaños de partícula incluyendo 0,95 micrómetros). El oro microcristalino proporciona una distribución de tamaño de partícula diversa, típicamente en el intervalo de 0,5-5 micrómetros. Sin embargo, el área de superficie irregular del oro microcristalino posibilita un revestimiento de alto rendimiento con ácidos nucleicos. Se conocen y se han descrito varios procedimientos para revestir o precipitar partículas de oro o tungsteno con NOI. La mayoría de tales procedimientos generalmente combinan una cantidad predeterminada de oro o tungsteno con ADN plasmídico, CaCl₂ y espermidina. La solución resultante se agita por vórtex de forma continua durante el procedimiento de revestimiento para asegurar la uniformidad de la mezcla de reacción. Después de precipitación del NOI, las partículas revestidas pueden transferirse a membranas adecuadas y puede permitirse que sequen antes de su uso, revestir con ellas superficies de un módulo o casete de muestra, o cargarse en un casete de suministro para su uso en instrumentos de pistola génica particulares.

Las composiciones de partícula o partículas revestidas se administran al individuo de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que será eficaz para los fines de la invención. La cantidad de la composición a suministrar (por ejemplo, aproximadamente de 0,1 mg a 1 mg, más preferentemente de 1 a 50 ug del antígeno o alérgeno, depende del individuo a ensayar. La cantidad exacta necesaria variará dependiendo de la edad y condición general del individuo a tratar y puede determinarse fácilmente una cantidad eficaz apropiada por un experto en la materia tras leer la presente memoria descriptiva.

SUJETO MAMÍFERO HUÉSPED

Como se usa en el presente documento, la expresión "sujeto mamífero huésped" significa cualquier miembro del subfilo cordados, incluyendo, sin limitación, seres humanos y otros primates, incluyendo primates no humanos, tales como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja tales como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores, tales como ratones, ratas y cobayas; aves, incluyendo aves domésticas, silvestres y de caza, tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos y similares. Los términos no indican una edad particular. Por lo tanto, se pretende abarcar individuos tanto adultos como neonatos. Los procedimientos descritos en el presente documento se pretenden usar en cualquiera de las especies de vertebrados anteriores, puesto que los sistemas inmunes de todos estos vertebrados funcionan de forma similar. Si es un mamífero, el sujeto será preferentemente un ser humano, pero también puede ser un animal de ganado doméstico, sujeto de laboratorio o mascota.

El mamífero es preferentemente un ser humano. Cuando la composición inmunogénica (por ejemplo, vacuna) es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (por ejemplo niño en edad de empezar a caminar o bebé) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adolescente o un adulto. Una composición inmunogénica (por ejemplo, vacuna) pretendida para niños también puede administrarse a adultos, por ejemplo para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

PREVENIR Y/O TRATAR

La invención también proporciona las composiciones de la invención para su uso como medicamentos (por ejemplo, como composiciones inmunogénicas tales como vacunas) o como reactivos de diagnóstico. También proporciona el uso de las composiciones en la fabricación de: (i) un medicamento para tratar o prevenir un trastorno inmunológico. La invención también proporciona un procedimiento para tratar a un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de acuerdo con la invención.

La invención también proporciona el uso de las composiciones de la invención en la fabricación de un medicamento para inducir, modular, o potenciar una respuesta inmune en un mamífero. El medicamento es preferentemente una

composición inmunogénica tal como una vacuna y para la preparación de tales composiciones para prevenir y/o tratar un trastorno inmunológico. Debe apreciarse que todas las referencias en el presente documento a tratamiento incluyen tratamiento curativo, paliativo y profiláctico.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión “respuesta inmune” se refiere al desarrollo en un sujeto mamífero huésped de una respuesta inmune humoral y/o celular contra un antígeno. Como se usa en el presente documento, la expresión “respuesta inmune humoral” se refiere a una respuesta inmune mediada por moléculas de anticuerpo. Los anticuerpos generados por inmunidad humoral son principalmente eficaces contra agentes infecciosos extracelulares.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión “respuesta inmune mediada por células (CMI)” es una mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos. Los mecanismos inmunes CMI son generalmente más eficaces contra infecciones intracelulares y enfermedad porque los mecanismos CMI sensibilizan a los linfocitos T de modo que, cuando aparece un antígeno en un momento posterior, los linfocitos T de memoria se activan para dar como resultado una respuesta CMI que destruye las células diana que tienen el antígeno correspondiente o una parte del mismo en sus superficies celulares, y de este modo el patógeno infeccioso. La respuesta CMI se centra en la destrucción de la fuente de infección mediada por células efectoras que destruyen células infectadas del huésped por contacto directo de célula a célula y/o por la liberación de moléculas, tales como citocinas, que poseen actividad antiviral. Por lo tanto la respuesta a CMI, que se caracteriza por una respuesta celular de linfocitos T específica, es crucial para producir resistencia a enfermedades provocadas por cáncer, virus, microorganismos patógenos y otros intracelulares.

20 La administración de composición de bARE de la presente invención puede ser para fines “profilácticos” o “terapéuticos”. Como se usa en el presente documento, el término “terapéutico” o “tratamiento” incluye cualquiera de los siguientes: la prevención de infección o reinfección; la reducción, mitigación o eliminación de síntomas; y la reducción o eliminación completa de un patógeno. El tratamiento puede efectuarse de forma profiláctica (antes de la infección) o terapéutica (después de la infección).

25 La profilaxis o terapia incluye pero sin limitación inducir una respuesta inmune eficaz, preferentemente una respuesta inmune CMI y/o aliviar, reducir, curar o al menos detener parcialmente los síntomas y/o complicaciones resultantes de un trastorno inmune mediado por linfocitos T. Cuando se proporciona de forma profiláctica, la composición de bARE de la presente invención se proporciona típicamente antes de cualquier síntoma. La administración profiláctica de la composición de bARE de la presente invención es para prevenir o mitigar cualquier infección o enfermedad posterior. Cuando se proporciona de forma terapéutica, la composición de la presente invención se proporciona típicamente en (o poco después de) la aparición de un síntoma de infección o enfermedad para atenuar, por ejemplo, un síntoma real. Por lo tanto, la composición de la presente invención puede proporcionarse antes de la exposición anticipada a un agente causante de enfermedad o patología o después del inicio de una infección o enfermedad.

35 Si la administración profiláctica o terapéutica (sola o como parte de una composición) es la más apropiada dependerá habitualmente de la naturaleza de la enfermedad. Como ejemplo, la composición de la presente invención podría usarse en protocolos de inmunoterapia para inducir de forma activa inmunidad por vacunación. Esta última forma de tratamiento es ventajosa porque la inmunidad se prolonga. Por otro lado una composición preferentemente, aunque no necesariamente, se usará de forma profiláctica para inducir una respuesta CMI eficaz, contra antígenos que se encuentran posteriormente o partes de los mismos (tales como epítomos) relacionados con el antígeno diana.

La dosis de composición de bARE administrada a un sujeto huésped, en el contexto de la presente invención, habitualmente está en una cantidad suficiente para efectuar una respuesta inmune profiláctica o terapéutica beneficiosa, preferentemente una respuesta CMI, en el sujeto a lo largo del tiempo.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión “dosis profiláctica o terapéuticamente eficaz” significa una dosis en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune potenciada, preferentemente una respuesta CMI a uno o más antígenos o epítomos, cuando se administra, por ejemplo, como parte de una composición de bARE y/o para aliviar, reducir, curar o al menos detener parcialmente los síntomas y/o complicaciones de un trastorno inmune mediado por linfocitos T.

50 Las composiciones inmunogénicas como se describen en el presente documento comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno o antígenos, así como cualquier otro componente, según se necesite. Por “cantidad inmunológicamente eficaz” se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, en una dosis sencilla o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo a tratar, edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.) la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del doctor a cargo del tratamiento de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad quede en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos rutinarios. Las composiciones de la presente invención pueden evaluarse en modelos animales *in vitro* e *in vivo* antes de su administración a huésped, por ejemplo, humano.

DOSIFICACIÓN

Puede conseguirse profilaxis o terapia por una administración directa sencilla en un punto temporal sencillo o múltiples puntos temporales. La administración también puede suministrarse a un sitio sencillo o sitios múltiples. Algunas vías de administración, tales como administración mucosa mediante gotas oftálmicas pueden requerir una dosis mayor. Los expertos en la materia pueden ajustar la dosificación y concentración para adecuarla a la vía particular de suministro.

En una realización, el tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis sencilla o un programa de dosis múltiple. Pueden usarse dosis múltiples en un programa de inmunización primario y/o en un programa de inmunización de refuerzo. En un programa de múltiples dosis, las diversas dosis pueden proporcionarse por la misma o diferentes vías tal como, pero sin limitación, una sensibilización parenteral y refuerzo de mucosa o una sensibilización de mucosa y refuerzo parenteral.

MOLÉCULAS DE AB₅ MUTANTES

Las proteínas bARE estabilizadas y proteínas AB₅ estabilizadas de acuerdo con la presente invención pueden usarse para prevenir o tratar infecciones y/o trastornos en seres humanos. También pueden usarse toxinas bacterianas de AB₅ mutantes, tales como LTK63 para prevenir o tratar infecciones y/o trastornos en seres humanos. En particular, LTK63 estabilizada es útil como un adyuvante de mucosa no tóxico en mezcla con un segundo antígeno. La preparación de mutantes LTK63 y la formulación de los tres mutantes en vacunas como adyuvantes de mucosa se describe en detalle en publicaciones anteriores del Solicitante y solicitudes de patente, incluyendo Tierney y col., J Infect Dis 188 (2003) 753-8; y Baudner y col., Vaccine 21 (2003) 3837-3844; y Solicitudes de Patente Internacional N° WO 93/13202 y WO97/02348 de Biocine SpA (ahora Chiron SpA).

Dada la divulgación proporcionada en la presente solicitud y las solicitudes referidas anteriores, el procedimiento de preparación de formulaciones de vacuna que incorporan proteínas AB₅ estabilizadas apropiadas de acuerdo con la presente invención, particularmente toxinas bacterianas AB₅ genéticamente detoxificadas, tales como LTK63, resultará evidente para un experto en la materia.

Por lo tanto, en ciertos aspectos, la invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden una proteína de clase AB₅ estabilizada, en particular en las que la proteína de clase AB₅ es una toxina bacteriana inmunogénica genéticamente detoxificada, tal como LTK63. En ciertas realizaciones, la composición inmunogénica es una vacuna humana. La proteína de clase AB₅ estabilizada puede ser el agente antigénico de la composición, o un adyuvante para otro agente antigénico de la composición. En una realización específica, la proteína de clase AB₅ estabilizada es un adyuvante de mucosa.

PATOLOGÍAS

Las composiciones de la presente invención pueden usarse para prevenir y/o tratar trastornos tales como, pero sin limitación: neumonía, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, bronquitis, faringitis, laringitis, sinusitis, enfermedades pulmonares obstructivas, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, artritis reactiva, otitis media, aneurisma aórtico abdominal, eritema nodoso, síndrome de Reiter, sarcoidosis, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, linfogranuloma venéreo, tracoma ocular, enfermedad inflamatoria pélvica, conjuntivitis de inclusión, tracoma genital, neumonitis del infante, tracoma incipiente, queratitis, hipertrofia papilar, infiltración corneal, vulvovaginitis, rinitis mucopurulenta, salpingitis, cervicitis, folículos cervicales, prostatitis, proctitis, uretritis, linfogranulo inguinal, bubón climático, bubón tropical y/o estiomene.

KITS

La composición de bARE de la presente invención puede estar en un kit. El kit también puede incluir un adyuvante, preferentemente se administra un adyuvante genético con o como parte de la composición de bARE e instrucciones para administrar la molécula biológica. Otros componentes preferidos del kit incluyen un aplicador para administrar la composición de bARE. Como se usa en el presente documento, el término "aplicador" se refiere a cualquier dispositivo que incluye pero sin limitación una aguja hipodérmica, pistola génica, dispositivo de aceleración de partículas, nebulizador, cuentagotas, broncoscopio, supositorio, material insertable en la vagina impregnado o revestido tal como un tampón, preparación de ducha, solución para irrigación vaginal, preparación de enema de retención, supositorio o solución para irrigación rectal o colónica para aplicar la composición de bARE por vía sistémica, mucosa o transdérmica al sujeto huésped.

El kit puede incluir adicionalmente un segundo componente que comprende uno o más de los siguientes: instrucciones, jeringa u otro dispositivo de suministro, adyuvante, o solución de formulación farmacéuticamente aceptable. Un dispositivo de suministro puede precargarse con las composiciones de bARE de la invención.

Ejemplos

Los materiales y técnicas y aparatos asociados de la presente invención se describirán ahora con referencia a varias realizaciones. Se ilustran propiedades y características importantes de las realizaciones descritas en las estructuras

en el texto. Aunque la invención se describirá junto con estas realizaciones, debería entenderse que la invención no pretende limitarse a estas realizaciones. En la siguiente descripción, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar un entendimiento exhaustivo de la presente invención. La presente invención puede practicarse sin algunos o todos estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito operaciones de procedimiento bien conocidas en detalle para no oscurecer innecesariamente la presente invención.

Ejemplo 1

Separación de formas AB₅ y B₅ de LTK63 en GF-HPLC

LTK63, una proteína oligomérica de aproximadamente 82 kDa, es un mutante no tóxico de LT (enterotoxina lábil por calor), obtenida por mutagénesis específica en subunidad A que conserva la organización estructural de la molécula nativa. La subunidad A de LTK63 está compuesta de una cadena polipeptídica sencilla de 240 aminoácidos, con un PM de 27 kDa. La subunidad B es un pentámero formado por 5 monómeros idénticos de 103 aminoácidos cada uno, con un PM de 55 kDa. Ambas subunidades contienen un alto porcentaje de aminoácidos cargados positivamente (IP de la subunidad A = 6,3; IP de la subunidad B₅ = 9,1; IP de AB₅ integral = 8,5).

Las técnicas analíticas usadas convencionalmente para caracterizar la proteína LTK63 (electroforesis, inmunotransferencia, espectrometría de masas y análisis de aminoácidos) no puede distinguir la forma AB₅ integral de la molécula de las formas subunitarias A o B₅ disociadas. Los sistemas de GF-HPLC convencionales no permiten una buena separación de los picos de AB₅ y B₅ debido a sus tiempos de retención extremadamente cercanos. Un nuevo sistema de GF-HPLC permite una separación eficaz.

A continuación un ejemplo comparativo:

Análisis de GF-HPLC convencional en TSK G3000SWxl

Instrumento: Alliance 2695 Waters

Tampón: KPi 100 mM + Na₂SO₄ 100 mM pH 7,2

Flujo: 0,5 ml/min

Detección: PDA 996® 214 y 280 nm

Columna: TSK G3000SWxl Tosoh

Material: gel de sílice

Mod superficial: grupos -OH residuales

Tamaño de partícula: 5 µm

Porosidad: 250 Å

Se procesaron muestras de LTK63 (proteína AB₅) en tres tampones convencionales conocidos diferentes (PBS, 0,25 % CHAPS y citrato) en este sistema cromatográfico. La diferencia de los tiempos de retención (TR) de las formas AB₅ y B₅ usando este sistema es mínima y los picos no están bien resueltos, haciendo difícil determinar el contenido de forma subunitaria B₅ en muestras de LTK63.

Con referencia a la Figura 1A, puede verse que en el tiempo cero (inmediatamente después de la preparación de muestra), hay un pico sencillo en el cromatograma que se supone que representa AB₅ integral. La superposición de los cromatogramas respectivos para las tres muestras mostró que los perfiles pico y TR son casi idénticos. Con referencia a la Figura 1B, después de cinco días, un segundo pico, supuestamente correspondiente a la forma B₅ y que muestra algo de disociación de la proteína AB₅, aparece desplazado hacia la derecha. Sin embargo, la separación es mínima y no permite una determinación cuantitativa del alcance de disociación de la molécula AB₅.

Nuevo análisis de GF-HPLC en Ultrahydrogel 250

Instrumento: Alliance 2695 Waters

Tampón: KPi 100 mM + Na₂SO₄ 100 mM pH 7,2

Flujo: 0,5 ml/min

Detección: PDA 996® 214 y 280 nm

Columna: Ultrahydrogel 250 Waters

Material: polimetacrilato hidroxilado

Mod superficial: grupos -COOH residuales

Tamaño de partícula: 6 µm

Porosidad: 250 Å

La Figura 1C representa el cromatograma de las mismas muestras de cinco días repetidas en el nuevo sistema cromatográfico, de acuerdo con la presente invención, mostrando claramente dos picos bien resueltos representativos de las formas B₅ (pico izquierdo) y AB₅ (pico derecho), respectivamente. Se ve degradación sustancial de la muestra para los tres tampones convencionales, en particular, el tampón citrato.

La Figura 1D proporciona una comparación de procesamiento de muestra de LTK63 en TSK G3000SWxl y Ultrahydrogel 250 y SDS-PAGE. Parece que el pico con el menor tiempo de retención (TR) que usa la columna Ultrahydrogel 250 es el pico de la subunidad B₅. Esta resolución sugiere que el mecanismo de separación no es

meramente un mecanismo de Filtración en Gel o que las dimensiones relativas de las moléculas no son proporcionales a su peso molecular (PM). La Figura 1D también proporciona una comparación de los valores de área y porcentaje de área obtenidos para la misma muestra de LTK63 usando las diferentes columnas en las mismas condiciones analíticas. El porcentaje de área para la muestra de LTK63 separada en la columna de Ultrahydrogel 250 es 16 % B₅: 83 % AB₅ que es una Relación de Integridad de aproximadamente 1:5 para B₅:AB₅.

Ejemplo 2

Optimización de las condiciones de elución

La **Tabla 1** muestra la composición de cuatro tampones usados para eluir una muestra de AB₅ parcialmente disociada (que contiene ambas formas AB₅ y B₅) del sistema de separación en columna de Ultrahydrogel descrito en el Ejemplo 1.

Tabla 1

Nombre de la muestra	Fecha de Adquisición	Eluyente	Volumen de Inyección	Canal	Dilución
1. PBS 5 g agitación	09/04/2003 9.55.19	KPi 50 mM + Na ₂ SO ₄ 50 mM pH 7,2	100,00	214 nm	4,00
2. PBS 5 g agitación	08/04/2003 13.53.06	KPi 100 mM + Na ₂ SO ₄ 100 mM pH 7.2	100,00	214 nm	4,00
3. PBS 5 g agitación	09/04/2003 15.07.11	KPi 250 mM + Na ₂ SO ₄ 100 mM pH 7,2	100,00	214 nm	4,00
4. PBS 5 g agitación	10/04/2003 9.51.42	KPi 200 mM + pH 7,2	100,00	214 nm	4,00

Las Figuras 2A-D representan cromatogramas que ilustran el efecto de la fuerza iónica sobre la selectividad de formas AB₅ y B₅ en el sistema. Una mayor fuerza iónica provoca una mayor separación neta de los dos picos, hasta la degradación parcial de AB₅ cuando la concentración salina alcanza 200 mM. El pico de AB₅ se ve más afectado por la variación de fuerza iónica, mientras que el TR del pico B₅ permanece sustancialmente sin cambios con fuerza iónica cambiante.

La Figura 3 ilustra el perfil cromatográfico de la muestra de LTK63 en el siguiente tampón de elución: KPi 200 mM + Na₂SO₄ 100 mM; pH 7,2. Este tampón proporciona una separación de AB₅ / B₅ ideal en este sistema cromatográfico.

Ejemplo 3

Atribución de picos de AB₅ y B₅

Fraccionamiento y SDS-PAGE

Para verificar la atribución de los picos obtenidos en las separaciones de GF-HPLC de acuerdo con la presente invención a las formas AB₅ y B₅ de la proteína, se separó una muestra de LTK63 parcialmente disociada como se muestra en el cromatograma de la Figura 4. La muestra se fraccionó para investigación adicional. Para el fraccionamiento, la muestra se inyectó tres veces en el nuevo sistema cromatográfico descrito en el Ejemplo 1 y se recogieron seis fracciones de 500 µl de volumen para cada ciclo de 13,8 a 19,8 minutos. Las mismas fracciones de cada ciclo se agruparon después para obtener un volumen final de 1,5 ml/fracción. Se volvieron a inyectar las fracciones 0-5 después en el sistema de HPLC y se analizaron por SDS-PAGE. Los resultados se muestran en las Figuras 5A y 5B, que muestran los cromatogramas y perfiles de SDS-PAGE, respectivamente, de las fracciones de la muestra de LTK63 cuya separación se muestra en la Figura 4. El pico con el menor tiempo de retención (TR), presente en las fracciones 1 y 2, contiene solamente B₅, mientras que el pico con el mayor TR, presente en las fracciones 3 y 4 migra en SDS-PAGE como 2 bandas distintas de A y B_m, que representan AB₅.

Caracterización Dimensional: Peso Molecular Aparente

Se realizó una curva de calibración de la columna de Ultrahydrogel con proteínas convencionales de PM conocido.

El R2 correspondiente fue de 0,95 (Figura 5C).

El tiempo de retención del pico de la proteína de referencia CRM197 en la curva dio un PM aparente de 57 kDa (56,9 teórico); el PM aparente de B₅ en la misma curva resultó ser 65 kDa (55 teóricos). El PM de AB₅ resultó ser 9,6 kDa (82 kDa teóricos), lo que confirma que en este caso actúan mecanismos de separación distintos de Filtración en Gel (véase Figura 5D).

Caracterización Dimensional: Análisis de Dispersión de la Luz

Se obtuvo caracterización adicional de los picos de GF-HPLC mediante el uso de un detector de dispersión de la luz en línea (MALLS) acoplado a GF-HPLC: Dawn EOS Wyatt de ángulo 18 (véase Figura 5E). La ordenada en el origen da el PM. La pendiente inicial proporciona el valor del radio para cada corte.

La **Tabla 2**, a continuación, agrupa los datos de MALLS para tres muestras de LTK63 diferentes y para BSA usada como control. Se indican los siguientes parámetros: PM absoluto en Dalton; poli dispersión de picos (valor de 1 para moléculas monodispersadas = proteínas); radio de giro en nanómetros (medida de dimensión molecular; límite inferior sens. = 10 nm); el porcentaje junto a cada valor indica variabilidad del instrumento.

En todas las muestras, el pico con un TR más alto (AB₅) muestra un valor menor de radio de giro en comparación con B₅. Una posible explicación de este comportamiento cromatográfico inusual de la molécula de AB₅ es que, a pesar de su PM más pesado, su conformación es más compacta que B₅ solo. Los resultados son bastante similares para todas las muestras de LTK63: están presentes dos picos monodispersados, con un PM de aproximadamente 57 y 85 kDa de acuerdo con los valores esperados para B₅ y AB₅, respectivamente.

Tabla 2

muestra	pico	PM _{teor}	PM _{exp}	%	PM Mn Polidisp.	%	Rz	%
BSA	monómero	66.800	65.970	0,3	1,000	0,5	6,5	5
muestra	pico	PM _{teor}	PM _{exp}	%	PM Mn Polidisp.	%	Rz	%
K63 en fosfato 20 mM	AB ₅	82.000	85.450	0,3	1,001	0,4	5,1	5
K63 en chaps 0,05 %	AB ₅	82.000	85.300	0,3	1,001	0,5	6,5	6
K63 en chaps 0,25 %	AB ₅	82.000	85.470	0,3	1,000	0,4	4,3	5
muestra	pico	PM _{teor}	PM _{exp}	%	PM Mn Polidisp.	%	Rz	%
K63 en fosfato 20 mM	B ₅	55.000	58.030	0,4	1,000	0,6	16,5	3
K63 en chaps 0,05 %	B ₅	55.000	57.030	0,4	1,000	0,6	15,2	5
K63 en chaps 0,25 %	B ₅	55.000	57.530	0,5	1,000	0,6	19,9	5

Caracterización Dimensional: CL-ESI-EM

Se analizaron LTK63 nativa y 3 muestras obtenidas de fraccionamiento de GF-HPLC en CL-ESI-EM para confirmar la atribución de picos. Los detalles del instrumento usado son como sigue:

Instrumento: Alliance 2695 Waters
 Detección: PDA 996 Waters
 MS ZQ 4000 Micromass
 columna RP: Jupiter Phenomenex C4
 300 Å

La Figura 5F(b) muestra que el Pico 1 con un PM de aproximadamente 11.793 Da que correspondía al monómero B estaba presente en LTK63 nativa y en todas las fracciones. La Figura 5F(b) también muestra que el Pico 2 con un PM de 27.855/66 Da que correspondía a la subunidad A estaba presente en la fracción de LTK63 nativa y en la fracción 5.

Sumario de Resultados de los Ejemplos 1-3

(ejemplos comparativos entre la Nueva y la Antigua técnica de HPLC)

Se desarrolló un nuevo procedimiento de GF-HPLC que es una contribución importante a la técnica porque la integridad funcional de una proteína bARE, tal como una proteína AB5, puede evaluarse sin una pérdida de su estructura multimérica integral.

5 La estabilidad funcional de una proteína bARE, tal como una proteína AB5, puede determinarse en términos de formas disociadas y no disociadas de la proteína AB5; y puede determinarse el impacto de los agentes estabilizadores candidatos en la estabilidad funcional de la proteína bARE. En particular puede determinarse el impacto de los agentes estabilizadores físicos en la estabilidad funcional de una proteína bARE, tal como una proteína AB5 y la posibilidad de su estabilización.

10 Como demuestran los Ejemplos, se optimizaron las condiciones de elución usando el procedimiento de GF-HPLC y se investigó el efecto de la fuerza iónica en el tampón de elución, puesto que la fuerza iónica pareció influir en el tiempo de retención de la proteína AB₅ en la columna.

Los picos que eluyeron de la columna de GF-HPLC se caracterizaron de varias maneras: en primer lugar, la atribución de picos se verificó por análisis tanto de fraccionamiento como de SDS-PAGE para identificar los picos de B₅ y AB5 eluidos.

15 En segundo lugar, se llevó a cabo caracterización dimensional usando determinación de Peso Molecular (PM) aparente lo que indicó que estaban actuando mecanismos de separación distintos de Filtración en Gel menos para la elución de la proteína AB₅.

20 En tercer lugar, se llevó a cabo caracterización dimensional usando dispersión de la Luz en Línea (MALLS) para comprobar si los resultados de PM absolutos estaban de acuerdo con los valores teóricos para la subunidad de AB₅ y B₅.

Los resultados indicaron que los picos se componían de material homogéneo. Sin embargo, los valores dimensionales sugieren que AB5 estaba en una conformación más compacta que la subunidad B₅ sola. La caracterización dimensional obtenida usando CL-ESI-EM también proporcionó pruebas adicionales de atribución de picos.

25 **Ejemplo 4**

Aplicación del nuevo procedimiento analítico (GF-HPLC) de la presente invención en exploraciones con respecto a Agentes Estabilizadores

30 Antes del desarrollo del procedimiento analítico de la presente invención y la identificación de agentes estabilizadores y sus efectos sobre la estabilidad física y/o funcional de una proteína bARE, se observaron problemas de estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo de un volumen concentrado purificado de una proteína bARE, tal como la proteína mutante LTK63 en diferentes tampones y en diferente temperatura de almacenamiento.

Como ejemplo, el volumen de LTK63 almacenado a 4 °C en PBS a una concentración de proteína de 2,8 mg/ml después de 1 mes mostró la formación de varios "cristales" en la pared del frasco.

35 También hubo pruebas de precipitación de LTK63 a una concentración de proteína de 1-1,5 mg/ml después de 5 meses de almacenamiento a 2-8 °C en Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS) pH 7,4. El análisis de SDS-PAGE de muestras precipitadas indica precipitación de la proteína AB5 completa.

40 El volumen de LTK63 almacenado a -20 °C en PBS no muestra precipitación pero en el análisis de HPLC se observó la aparición del complejo B₅ lo que sugiere que la proteína AB5 se estaba disociando en las formas subunitarias A y B₅. Además, la aplicación del nuevo procedimiento analítico de GF-HPLC de la presente invención indicó que había pruebas de pérdida de integridad de LTK63 como se detectó por HPLC, después de 10 meses de almacenamiento a -20 °C en PBS + sacarosa 5 % a una concentración de proteína de 1,2 mg/ml.

45 La adición de sacarosa 5 % a PBS pareció proteger LTK63 por disociación en ciclos de congelación/descongelación. Sin embargo, en el almacenamiento a largo plazo a -20 °C de LTK63 en PBS más sacarosa 5 % se produjo de nuevo disociación de proteína.

En consecuencia, uno de los objetos de la presente invención fue proporcionar una composición de bARE de almacenamiento mejorado, en particular una composición de almacenamiento de AB5 mejorado, para estabilizar el volumen concentrado purificado de LTK63 a 2-8 °C hasta un intervalo de concentración proteica de entre 1 mg/ml y 4 mg/ml.

50 **Metodología**

Se realizó un primer intento de estabilizar LTK63 evitando precipitación/cristalización a 4 °C con variación de varios parámetros que afectaban a la estabilidad proteica. Se seleccionaron diversos tampones, tales como tampones acetato, citrato, fosfato y Tris. La concentración de NaCl se varió en el intervalo de 0-0,5 M; el pH se varió en el

intervalo de 5,5-7,5; y se usaron diversos aditivos tales como azúcares, detergentes, quelantes y aminoácidos. La concentración de proteína se mantuvo en el intervalo de 0,8-1,2 mg/ml en todos los tampones de almacenamiento usados. Los experimentos se realizaron en condiciones estáticas y agitando las muestras en un agitador de rotor a 4 °C. Los experimentos de agitación se prepararon para acentuar las condiciones de almacenamiento y para acelerar la precipitación de LTK63.

Resultados de exploración 4 (a)

Tabla 3

TAMPÓN	precipitación	
	agitado	estático
PBS	Sí	Sí
PBS + galactosa 0,1 mM	Sí	no
PBS + trehalosa 5 %	Sí	Sí
PBS + CHAPS 0, 25 %	no	no
PBS + ácido aminocaproico 5 %	Sí	Sí
Pi 20 mM pH 7,4	Sí	Sí
Pi 50 mM, NaCl 0,3 M, galactosa 0,2 M	Sí	Sí
Pi 20 mM pH 7,4 + L-Arginina 0,4 M	no	no
Acetato 50 mM, NaCl 300 mM pH 5,5	Sí	Sí
Ácido Cítrico 50 mM pH 6,5	Sí	no
Tris 50 mM, EDTA 1 mM pH 7,5	Sí	Sí
Tris 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 200 mM	Sí	no
NaCl 500 mM pH 5,8	Sí	no

Un análisis de los Resultados de la Tabla 3 indicó que la precipitación de muestras agitadas se producía en pocos días mientras que en condiciones estáticas, la precipitación tarda varios meses. Se seleccionaron dos aditivos, CHAPS y L-Arginina que evitaron la precipitación de LTK63 en condiciones tanto estáticas como de agitación.

Resultados de exploración 4(b)

Se han realizado análisis por SDS-PAGE de los sedimentos (no mostrados) y los sobrenadantes (véase Figura 6) a 1 y 6 días de agitación. A diferencia de las muestras estáticas, en condiciones de agitación se produce una disociación parcial de AB₅, dependiente de los tampones de almacenamiento, y el sobrenadante se enriquece de monómero B (B_m) o una forma oligomérica de subunidad B (B_x).

Ejemplo 5

Los resultados de SDS-PAGE del Ejemplo 4(b) indicaron que en condiciones de agitación, la proteína LTK63 es inestable y las subunidades A y B se disocian. Se examinó el efecto de dos tampones de almacenamiento, CHAPS y L-Arginina sobre la estabilidad de LTK63. Se seleccionaron dos tampones de almacenamiento: fosfato 20 mM pH 7,4 y CHAPS y fosfato 20 mM pH 7,4 y L-Arginina.

Resultados 5 (a)

La Figura 7 muestra que: En las condiciones tanto estáticas como de agitación, el aumento de la concentración de proteína hasta 1,5-2,0 mg/ml afecta a la precipitación de LTK63; por otro lado, la concentración de CHAPS en el intervalo 0,05 %-0,5 % no afecta significativamente al comportamiento de LTK63; y el SDS-PAGE de las muestras precipitadas con CHAPS no mostró una disociación de LTK63 en condiciones estáticas ni en agitación.

Sumario de los Resultados 5 (a)

Para una concentración proteica mayor de 1,5 mg/ml, la inclusión de CHAPS no parece tener un efecto protector

sobre la precipitación de LTK63. Sin embargo, la inclusión de CHAPS parece proteger la proteína AB₅ de disociación en su forma subunitaria.

Resultados 5(b)

La Figura 8 muestra que en condiciones estáticas, el aumento de la concentración proteica hasta 17 mg/ml no influyó en la precipitación proteica mientras que en condiciones de agitación, la precipitación de LTK63 se produce incluso a concentraciones de 2,0 mg/ml; la concentración de L-arginina en el intervalo 50 mM - 400 mM no afecta significativamente a la precipitación de LTK63; mientras que el SDS-PAGE de muestras precipitadas con L-Arginina en condiciones de agitación parecían indicar una disociación de LTK63.

Sumario de los Resultados 5(b)

L-Arginina fue capaz de evitar la precipitación proteica hasta concentración de proteína muy alta pero L-Arginina parece tener un efecto sobre la disociación de LTK63.

Ejemplo 6

Análisis comparativo de muestras agitadas con L-Arginina después de 30 días de agitación usando el procedimiento de HPLC Antiguo y el procedimiento de HPLC Nuevo.

Resultados 6

Un análisis de las Figuras 9(a) y 9(b) muestra que el procedimiento de HPLC antiguo (Figura 9(a)) no diferencia entre la proteína AB₅ multimérica nativa y su forma subunitaria B₅ disociada mientras que el nuevo procedimiento de HPLC permite no solamente una resolución de las formas AB₅ y B₅ sino también una cuantificación de las cantidades relativas de las formas disociada y no disociada usando diferentes concentraciones de arginina (0,2 M, 0,3 M y 0,4 M) calculando el porcentaje del área bajo los picos obtenido usando el procedimiento analítico de la presente invención.

Sumario de los Resultados 6

El alcance de la disociación de LTK63 determina la aparición de la forma subunitaria B₅ que se produce incluso en muestras no precipitadas y parece depender de la concentración de L-Arginina.

Ejemplo 7

La dependencia de disociación de LTK63 de la concentración de L-Arginina se estudió usando el nuevo procedimiento analítico de HPLC de la presente invención en muestras estáticas a diferentes concentraciones de LTK63 (1,3 mg/ml y 4,0 mg/ml).

Resultados 7

Un análisis de las Figuras 10(a) y 10(b) indica que: se produce aumento de B₅ incluso en muestras estáticas y depende de la concentración de L-Arginina. La pendiente de análisis de regresión lineal indicó que el alcance de la disociación de la proteína AB₅ no era dependiente de la concentración de proteína B₅.

Ejemplo 8

Metodología

El efecto de CHAPS en la disociación de LTK63 en condiciones estáticas se evaluó usando el nuevo procedimiento de HPLC de la presente invención. Un análisis de las Figuras 11(a) y 11 (b) indicó que la inclusión de CHAPS no tiene un efecto de disociación sobre LTK63 (Figura 11(a)); y que el aumento de B₅ en muestras tratadas con L-Arginina se inhibía parcialmente por la adición de CHAPS 0,05 % (Figura 11(b)).

Sumario Global de los Resultados 4-8

La inestabilidad de LTK63 depende de dos fenómenos diferentes: cristalización/precipitación y disociación. Dos aditivos, CHAPS y L-Arginina se seleccionaron para estabilizar sinérgicamente la proteína LTK63. Aunque CHAPS es incapaz de evitar la precipitación de LTK63 a alta concentración de LTK63 (aproximadamente 2 mg/ml), no se ha observado efecto disociativo. L-Arginina evita la precipitación de proteínas a una concentración de LTK63 muy alta (aproximadamente 17 mg/ml) pero la L-Arginina puede tener un efecto en la disociación de AB₅.

Con respecto a la combinación de CHAPS + L-Arginina como un aditivo estabilizador, la inclusión de CHAPS inhibe parcialmente la formación de subunidad B₅ en muestras de L-Arginina y cuando se incluye en combinación con L-Arginina, el aumento esperado de los niveles de B₅ durante un periodo de 12 meses fue de aproximadamente 1,5 %. Basándose en estas observaciones el uso de una combinación de CHAPS y L-Arginina parece proporcionar un efecto sinérgico con respecto a prevenir tanto la precipitación como la disociación de LTK63 a lo largo del tiempo. En particular, los experimentos de estabilidad para determinar la concentración de L-arginina (100-200 mM) y CHAPS

(0,05 – 0,25 %), cuando se usan en combinación, han mostrado que se obtuvieron resultados positivos con respecto a estabilidad después de 3 meses independientemente de la concentración de aditivos.

Ejemplo 9

Efecto de L-arginina y CHAPS sobre la estabilidad de LTK 63 a una concentración de proteína de 1,3 mg/ml durante un periodo de tiempo

LTK 63, a una concentración de proteína de 1,3 mg/ml se mantuvo a 2-8 °C en tampón de almacenamiento que contenía diferente concentración de L-arginina y CHAPS para comprobar los efectos de estos dos estabilizadores sobre la disociación y precipitación de proteínas. El porcentaje de B5 y las muestras se midió por análisis de HPLC durante hasta 8 meses de almacenamiento.

Resultados 9

La Tabla 4(a) y la Figura 12 muestran el efecto de L-Arginina (50 mM-400 mM) y CHAPS (0,25 %) sobre la estabilidad de LTK 63 a una concentración de proteína de 1,3 mg/ml durante un periodo de tiempo. Se observó precipitación de proteínas (ppt) en la muestra de control y la muestra agitada después de 118 días, que es aproximadamente 4 meses. No se observó precipitación en ninguna de las muestras estáticas después de 118 días. Sin embargo, se observó precipitación en dos de las cinco muestras estáticas después de 246 días, que es aproximadamente 8-9 meses.

Tabla 4(a)

Tampón	% B ₅ 214 nm							
	0 días	1 día	6 días	13 días	27 días	55 días	118 días	246 días
Fosfato 20 mM, pH 7,4	2,90	2,80	2,83	2,56	2,79	2,64	ppt	
Fosfato 20 mM, pH 7,4 + arginina 50 mM ESTÁTICO	2,99	2,56	2,82	2,50	2,87	2,82	3,04	ppt
Fosfato 20 mM, pH 7,4 + arginina 100 mM ESTÁTICO	3,03	2,86	2,94	2,69	2,94	3,08	3,29	4,26
Fosfato 20 mM, pH 7,4 + arginina 200 mM ESTÁTICO	3,12	3,13	3,09	2,92	3,3	3,36	3,79	4,65
Fosfato 20 mM, pH 7,4 + arginina 400 mM ESTÁTICO	3,64	3,58	3,53	3,40	3,80	4,11	4,80	5,71
Fosfato 20 mM, pH 7,4 + CHAPS 0,25 % ESTÁTICO	2,61	2,31	2,33	2,30	2,18	2,20	2,17	ppt
Fosfato 20 mM, pH 7,4 + CHAPS 0,25 % AGITADO	2,61	2,21	2,23	2,20	2,12	2,13	ppt	

Se representó un ajuste lineal del curso temporal de porcentaje de B5.

Tabla 4(b)

Tampón	Ajuste Lineal	
fosfato 20 mM , pH 7,4	$y = -0,0033x + 2,8087$	R ² = 0,291
Fosfato 20 mM , pH 7,4 + arginina 50 mM ESTÁTICO	$y = 0,0025x + 2,7218$	R ² = 0,2749
Fosfato 20 mM , pH 7,4 + arginina 100 mM ESTÁTICO	$y = 0,0054x + 2,8192$	R ² = 0,9181
Fosfato 20 mM , pH 7,4 + arginina 200 mM ESTÁTICO	$y = 0,0065x + 3,0439$	R ² = 0,9708
Fosfato 20 mM , pH 7,4 + arginina 400 mM ESTÁTICO	$y = 0,0092x + 3,5354$	R ² = 0,9718
Fosfato 20 mM , pH 7,4 + CHAPS 0,25 % ESTÁTICO	$y = -0,0022x + 2,3684$	R ² = 0,3759

Fosfato 20 mM , pH 7,4+ CHAPS 0,25 % AGITADO	$y = -0,0049x + 2,3334$	$R^2 = 0,3239$
--	-------------------------	----------------

Ejemplo 10**Metodología**

El efecto de CHAPS (0,05 %) y L-Arginina (50 mM-400 mM) sobre la disociación y precipitación de proteína se examinó a lo largo del tiempo (0, 2, 5, 12, 27, 55, 118 y 256 días).

- 5 LTK 63, a una concentración de proteína de 4,0 mg/ml se mantuvo a 2-8 °C en un tampón de almacenamiento que contenía diferente concentración de L-Arginina y la combinación L-Arginina + CHAPS. Sólo se observó precipitación de proteína (ppt) en una muestra después de 246 días. El porcentaje de B5 en las muestras se midió por análisis de HPLC durante hasta 8 meses de almacenamiento. Se realizó el curso temporal de porcentaje de B5 y se representó un ajuste lineal (Tablas 5(a), 5(b) y Figura 13).

10

Tabla 5(a)

Tampón	% B ₅ 214 nm							
	Día 0	2 días	5 días	12 días	27 días	55 días	118 días	246 días
fosfato 20 mM , pH 7,4 + arginina 50 mM ESTÁTICO	3,57	2,65	3,24	2,95	3,54	3,40	3,53	ppt
fosfato 20 mM , pH 7,4 + arginina 100 mM ESTÁTICO	3,51	2,68	3,27	2,92	3,6	3,41	3,76	3,94
fosfato 20 mM , pH 7,4 + arginina 200 mM ESTÁTICO	3,65	2,73	3,12	3,16	3,79	3,67	3,94	4,21
fosfato 20 mM , pH 7,4 + arginina 400 mM ESTÁTICO	3,93	3,27	3,9	3,64	4,36	4,42	4,89	5,80
fosfato 20 mM , pH 7,4 + arginina 200 mM + CHAPS 0,05 % ESTÁTICO	2,72	2,78	2,78	2,74	2,91	2,98	3,15	3,41

Tabla 5(b)

Tampón	Ajuste Lineal	
fosfato + arginina 50 mM ES	$y = 0,0037x + 3,1542$	$R^2 = 0,1999$
fosfato + arginina 100 mM ES	$y = 0,0035x + 3,1827$	$R^2 = 0,5089$
fosfato + arginina 200 mM ES	$y = 0,0043x + 3,2841$	$R^2 = 0,565$
fosfato + arginina 400 mM ES	$y = 0,0087x + 3,7714$	$R^2 = 0,8792$
fosfato+ arginina 200 mM +CHAPS 0,05 % ES	$y = 0,0027x + 2,7739$	$R^2 = 0,9544$

Análisis de los Resultados 9 y Resultados 10

- 15 El efecto de L-Arginina sobre la estabilidad de LTK 63 se confirmó en el sentido de que la L-Arginina protege contra la precipitación de proteínas. Cuando se incluyó una concentración de L-Arginina mayor de 50 mM, se obtuvo protección contra precipitación de LTK63 durante hasta 8 meses de almacenamiento de LTK63 (Tablas 4 y 5). Por otro lado, la L-Arginina tiene un efecto ligeramente disociativo en LTK63 (véase Figuras 12 y 13). La comparación de pendientes de los ajustes lineales obtenidos por el curso temporal del porcentaje de B5 muestra que la disociación depende de la concentración de L-Arginina: es decir, cuanto mayor sea la concentración de L-arginina más rápida
- 20 será la disociación (véase Tablas 4 y 5). Sin embargo, el efecto disociativo es tolerable, puesto que el aumento de porcentaje de B5 sólo varía de entre aproximadamente 0,1 % y aproximadamente 0,27 % por mes. El efecto de CHAPS sobre la disociación de LTK63 también se confirmó (Tablas 4(b) y 5(b)), aunque CHAPS no protege completamente contra la precipitación de proteína (véase Tabla 4(a)). La concentración de LTK63 parece tener una influencia menor sobre la disociación y/o precipitación de proteínas.

Ejemplo 11**Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad de LTK63 en tampones que contienen L-arginina + CHAPS**

- 5 Se mantuvo LTK 63, a una concentración de proteína de 2,0 mg/ml en condiciones estáticas y agitadas, a 2-8 °C en tampón de almacenamiento que contenía L-arginina 200 mM en combinación con diferente concentración de CHAPS. El porcentaje de B5 en las muestras se ha medido por análisis de HPLC hasta 8 meses de almacenamiento. Se ha realizado el curso temporal de porcentaje de B5 y se ha representado un ajuste lineal. En varias muestras se observó precipitación (ppt) de LTK 63.

Tabla 6(a)

Tampón	% B ₅ 214 nm					
	3 días	10 días	24 días	52 días	115 días	243 días
fosfato 20 mM , pH 7,4 + 200 mM arginina + CHAPS 0,05 % ESTÁTICO	3,28	3,4	3,49	3,56	3,81	4,31
fosfato 20 mM , pH 7,4 + arginina 200 mM + CHAPS 0,05 % AGITADO	3,29	3,35	3,42	3,53	3,77	ppt
fosfato 20 mM , pH 7,4+ arginina 200 mM + CHAPS 0,25 % ESTÁTICO	3,29	3,39	3,45	3,57	3,78	4,18
fosfato 20 mM , pH 7,4 + arginina 200 mM + CHAPS 0,25 % AGITADO	3,24 ,	3,37	3,4	3,55	3,83	ppt

10

Tabla 6(b)

Tampón	Ajuste Lineal	
Fosfato 20 mM ,pH 7,4 +arginina 200 mM + CHAPS 0,05 % ESTÁTICO	$y = 0,004x + 3,342$	R ² = 0,9875
Fosfato 20 mM ,pH 7,4+ arginina 200 mM + CHAPS 0,05 %AGITADO	$y = 0,0041x + 3,3033$	R ² = 0,9915
Fosfato 20 mM ,pH 7,4 + arginina 200 mM + CHAPS 0,25 % ESTÁTICO	$y = 0,0035x + 3,348$	R ² = 0,9852
Fosfato 20 mM ,pH 7,4+ arginina 200 mM + CHAPS0,25 %AGITADO	$y = 0,0049x + 3,2784$	R ² = 0,9751

Análisis de los Resultados 11

- 15 LTK 63, incluso en presencia de L-arginina y CHAPS precipita el almacenamiento en agitación a largo plazo, es decir, después de 8 meses (véase Tabla 6(a)). Sin embargo, la agitación no tiene efecto sobre la disociación de proteínas (Figura 14), la inclusión de concentración de CHAPS (en el intervalo 0,05 %-0,25 %) no tiene efecto importante sobre la protección de LTK 63 frente a disociación, como se determina por las pendientes de ajustes lineales (Tabla 6(b)).

Ejemplo 12**Comparación de estabilidad de LTK 63 en tampones de almacenamiento de L-arginina y L-arginina + CHAPS**

- 20 Se ha mantenido LTK 63, a una concentración de proteína de 2,0 mg/ml, en condiciones estáticas y en agitación, a 2-8 °C en tampón de almacenamiento que contenía L-arginina 200 mM o en combinación con CHAPS 0,05 %. Se ha medido el porcentaje de B5 en las muestras por análisis de HPLC hasta 7 meses de almacenamiento. Se ha representado el curso temporal de porcentaje de B5 y se ha realizado un ajuste lineal.

Tabla 7(a)

Tampón	% B ₅ 214 nm				
	3 días	18 días	65 días	209 días	
fosfato 20 mM, pH 7,4 + arginina 200 mM ESTÁTICO	6,97		7,02	8,08	diafiltración sin CHAPS

fosfato 20 mM, pH 7,4 + arginina 200 mM + CHAPS 0,05 % ESTÁTICO	5,62	5,8	5,86	6,62	
fosfato 20 mM, pH 7,4 + arginina 200 mM + CHAPS 0,05 % AGITADO	5,67	5,84	5,09	6,7	
fosfato 20 mM, pH 7,4 + arginina 200 mM + CHAPS 0,05 % ESTÁTICO	5,3		6,27	7,11	diafiltración con CHAPS
fosfato 20 mM, pH 7,4 + arginina 200 mM + CHAPS 0,05 % AGITADO	5,35	6,09	6,34	7,29	

Tabla 7(b)

Tampón	Ajuste Lineal		
fosfato 20 mM, pH 7,4 + arginina 200 mM ESTÁTICO	$y = 0,0057x + 6,827$	$R^2 = 0,9835$	diafiltración sin CHAPS
fosfato 20 mM, pH 7,4 + arginina 200 mM + CHAPS 0,05 % ESTÁTICO	$y = 0,0046x + 5,6321$	$R^2 = 0,976$	
fosfato 20 mM, pH 7,4 + arginina 200 mM + CHAPS 0,05 % AGITADO	$y = 0,0051x + 5,4493$	$R^2 = 0,516$	
fosfato 20 mM, pH 7,4 + arginina 200 mM + CHAPS 0,05 % ESTÁTICO	$y = 0,0083x + 5,4634$	$R^2 = 0,930$	diafiltración con CHAPS
fosfato 20 mM, pH 7,4 + arginina 200 mM + CHAPS 0,05 % AGITADO	$y = 0,008x + 5,6758$	$R^2 = 0,885$	

Análisis de los Resultados 12

- 5 El efecto protector de CHAPS contra disociación de proteínas se muestra por la comparación de las pendientes (Tabla 6(b)). Sin embargo, la presencia de CHAPS durante la etapa de diafiltración parece tener un efecto negativo en la disociación de LTK 63 (Tabla 6(b)).

Sumario de Resultados de los Ejemplos 4-12

- 10 Los estudios de estabilidad de los inventores demostraron que el volumen concentrado purificado de LTK 63 mostró una inestabilidad a largo plazo (durante un periodo de no menos de un año) en el sentido de que se produjo precipitación a 2-8 °C y disociación a -20 °C después de varios meses de almacenamiento. La inclusión de L-arginina en el tampón de almacenamiento a una concentración mayor de 50 mM evitó la precipitación de LTK 63 a una temperatura de almacenamiento en el intervalo de 2-8 °C durante un periodo de 8 meses. El efecto de disociación resultante de la L-arginina en sí misma parece ser muy ligero y depende de la concentración de L-arginina (variando el aumento de porcentaje de B5 entre aproximadamente 0,1 % y 0,27 % por mes). La inclusión de
- 15 CHAPS no evita la precipitación de LTK 63 durante almacenamiento a largo plazo. Sin embargo, la inclusión de CHAPS al menos 0,05 % puede reducir el efecto de disociación causado por L-arginina en aproximadamente 60-80 %, según se determina por la comparación de pendientes de análisis de regresión (Tablas 5(b) y 7(b)). El efecto protector del CHAPS frente a disociación de LTK 63 no parece depender de la concentración de CHAPS en el intervalo entre 0,05 y 0,25 %. La combinación de los dos estabilizadores parece proporcionar un efecto sinérgico con
- 20 respecto a prevención de la precipitación de proteínas (estabilización física) y disociación de proteínas (estabilización funcional).

SUMARIO GENERAL

- 25 Se desarrolló un nuevo procedimiento analítico para analizar una muestra de proteína bARE en condiciones no disociativas que diferencian entre proteínas de clase bARE integrales y disociadas. Este procedimiento analítico realiza una contribución importante a la técnica porque:

- (i) la integridad funcional de una proteína bARE, tal como una proteína AB5, puede evaluarse sin una

pérdida de su estructura multimérica integral;

(ii) la estabilidad funcional de una proteína bARE, tal como una proteína AB5, puede determinarse con respecto a formas no disociadas y disociadas de la proteína AB5; y

5 (iii) puede determinarse el impacto de los agentes estabilizadores candidatos sobre la estabilidad funcional de la proteína bARE, tal como una proteína AB5. En particular puede determinarse el impacto de los agentes estabilizadores físicos sobre la estabilidad funcional de una proteína bARE, tal como una proteína AB5.

El desarrollo de un procedimiento analítico tal es ventajoso por las siguientes razones.

10 En primer lugar, hasta ahora, no estaba disponible ningún procedimiento analítico para evaluar la integridad de una proteína bARE sin pérdida de su estructura integral. En consecuencia, esta es la primera vez que puede determinarse la existencia de una proteína bARE sustancialmente integral.

15 En segundo lugar, esta es la primera vez que se ha identificado un agente estabilizador funcional para una proteína bARE. Puesto que no estaba disponible previamente ningún procedimiento para determinar la estabilidad funcional de una molécula bARE en condiciones no disociativas que diferencian entre proteínas de clase bARE integrales y disociadas, no puede identificarse ningún agente estabilizador capaz de mantener la estabilidad funcional o integridad de una proteína bARE.

20 En tercer lugar, esta es la primera vez que se ha identificado un agente estabilizador de bARE selectivo. En particular, se desvelan en el presente documento agentes estabilizadores capaces de estabilizar físicamente una proteína bARE sin afectar a la estabilización funcional de la proteína bARE. De forma similar, también se desvelan agentes estabilizadores capaces de estabilizar funcionalmente una proteína bARE sin afectar a la estabilización física de la proteína.

25 Se proporcionan composiciones que comprenden un polipéptido bARE de clase AB5 estabilizado como un componente terapéuticamente activo y procedimientos útiles en su preparación. La composición es una composición de bARE estabilizada que incluye una proteína bARE cuya eficacia como un componente terapéuticamente activo puede verse comprometida durante el almacenamiento como resultado de agregación del polipéptido bARE. Por lo tanto las composiciones de bARE estabilizadas de la invención comprenden, además de una proteína bARE que puede mostrar formación de agregados durante el almacenamiento en una formulación líquida, una cantidad de arginina suficiente para reducir la formación de agregados de la proteína bARE durante el almacenamiento. Las composiciones comprenden adicionalmente un derivado de colesterol con un ácido carboxílico a una concentración eficaz para transmitir estabilidad funcional a la proteína bARE.

30 La composición de bARE puede incorporar adicionalmente otros agentes estabilizadores para aumentar adicionalmente la estabilidad del polipéptido bARE de clase AB5. Se dice que tales composiciones de bARE están estabilizadas, puesto que la adición de una base aminoacídica en combinación con un agente zwitteriónico da como resultado que la composición bARE tenga estabilidad de almacenamiento aumentada en relación con composiciones formuladas en ausencia de la combinación de estos dos componentes.

35 También se proporcionan procedimientos para aumentar la estabilidad de un polipéptido bARE en una composición y para aumentar la estabilidad de almacenamiento de una composición tal. Los procedimientos comprenden incorporar a la composición una cantidad de una base aminoacídica suficiente para reducir la formación de agregados del polipéptido bARE durante el almacenamiento de la composición y un agente zwitteriónico. Los procedimientos encuentran uso en la preparación de las composiciones de la invención.

40 Aunque se ha descrito la invención anterior en cierto detalle para fines de claridad de entendimiento, resultará evidente que pueden practicarse ciertos cambios o modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Debería observarse que existen muchos modos alternativos para implementar tanto los procedimientos como las composiciones de la presente invención. En consecuencia, las presentes realizaciones deben considerarse
45 como ilustrativas y no restrictivas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende proteína de clase bARE AB5, arginina y un derivado de colesterol con un ácido carboxílico.
- 5 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la arginina está presente en una cantidad de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 400 mM.
3. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que dicho derivado de colesterol está presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 0,5 % en peso por volumen (p/v).
- 10 4. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho derivado de colesterol se selecciona de CHAPS (3-(3-colamidopropil)-dimetilamonio-1-propanosulfonato) y CHAPSO (3-(3-colamidopropil)-dimetilamonio-2-hidroxi-propanosulfonato).
5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho derivado de colesterol es CHAPS.
- 15 6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la proteína AB5 es una proteína LTK63 o LTR72.
7. Un procedimiento para estabilizar una proteína bARE AB5 comprendiendo el procedimiento proporcionar una proteína bARE AB5 y combinar la proteína bARE AB5 con arginina y un derivado de colesterol con un ácido carboxílico.
- 20 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicho derivado de colesterol es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5.
9. El procedimiento de las reivindicaciones 7 u 8, en el que la proteína bARE AB5 es una proteína LTK63 o LTR72.
10. Un procedimiento para analizar una proteína de clase bARE AB5 en condiciones no disociativas que diferencia entre proteínas de clase bARE integrales y disociadas, **caracterizado porque** el procedimiento comprende una etapa de separación en un material de separación polimérico cargado, en el que el material de separación es un material de polimetacrilato hidroxilado (HEMA) con grupos carboxilo residuales.
- 25 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el HEMA tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 6 micrómetros.
12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que HEMA tiene una porosidad de aproximadamente 250 Å.
- 30 13. Un procedimiento para analizar una proteína de clase bARE AB5 comprendiendo el procedimiento:
 - (i) aplicar una proteína de clase bARE AB5 a un material de separación polimérico cargado en un aparato configurado para diferenciar una proteína de clase bARE AB5 integral de una proteína de clase bARE AB5 disociada, en el que el material de separación es un material de polimetacrilato hidroxilado (HEMA) con grupos carboxilo residuales;
 - 35 (ii) tratar el material de separación que comprende la proteína de clase bARE AB5 aplicada con un tampón iónico; y
 - (iii) detectar una o más proteínas de clase bARE AB5 integrales o disociadas.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el material de separación es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 11-12.
- 40 15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14, en el que el tampón iónico es un tampón fisiológicamente aceptable con un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0.
16. Un procedimiento para identificar un agente de estabilización de proteína de clase bARE AB5 comprendiendo el procedimiento:
 - 45 (i) combinar un agente de estabilización de proteína de clase bARE AB5 para formar una muestra de proteína bARE AB5;
 - (ii) aplicar la muestra de proteína bARE AB5 a un material de separación polimérico cargado en un aparato configurado para diferenciar una proteína de clase bARE AB5 integral de una proteína de clase bARE AB5 disociada, en el que el material de separación es un material de polimetacrilato hidroxilado (HEMA) con grupos carboxilo residuales;
 - 50 (iii) tratar el material de separación que comprende la proteína de clase bARE AB5 aplicada con un tampón iónico;

- (iv) detectar una o más proteínas de clase bARE AB5 integrales o disociadas; y
- (v) determinar si el agente estabilizador candidato es un agente estabilizador de proteína bARE AB5.

17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el procedimiento comprende calcular una Relación de Integridad para la muestra de proteína bARE AB5.
- 5 18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el procedimiento (adicionalmente) comprende comparar la relación de integridad para la muestra de proteína bARE AB5 con una relación de integridad para un control sin un agente estabilizador candidato.
19. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 16-18, en el que el material de separación es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 11-12.
- 10 20. Una composición inmunogénica que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
21. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende adicionalmente un adyuvante, en la que dicho adyuvante no es proteína bARE AB5.
- 15 22. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 21, en la que el adyuvante es un adyuvante de mucosa.
23. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en la preparación de un medicamento para prevenir y/o tratar un trastorno inmune.
24. Uso de una combinación de Arginina y un derivado de colesterol con un ácido carboxílico, para estabilizar físicamente una proteína bARE AB5.
- 20 25. Uso de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el derivado es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5.
26. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-25, en el que la proteína bARE AB5 es una proteína LTK63 o LTR72.

	Nombre de muestra	Volumen de iny.	Canal	Dilución
1	K63 en PBS	100,00	214 nm	4,00
2	K63 en Chaps 0,25 %	100,00	214 nm	4,00
3	K63 en citrato	100,00	214 nm	4,00

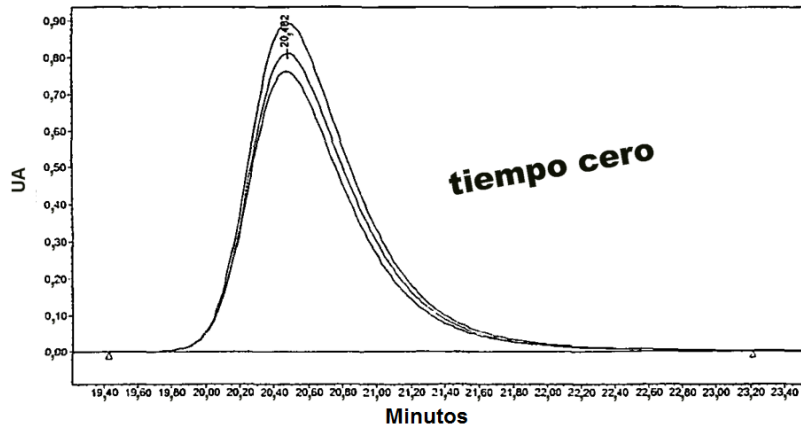


Figura 1A

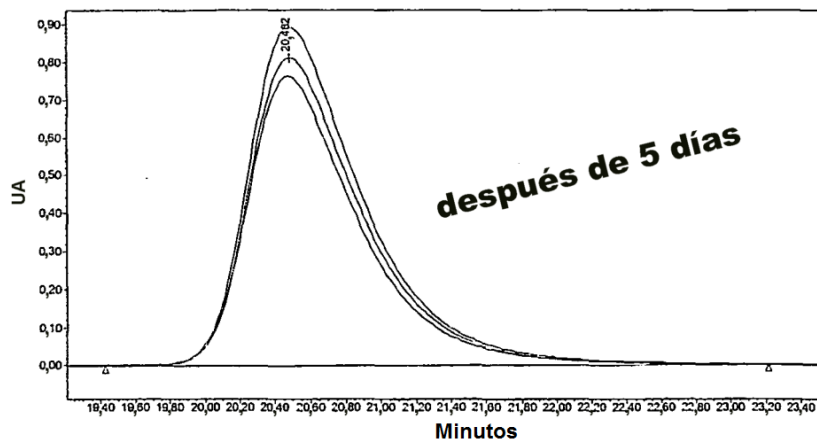


Figura 1B

Figura 1C

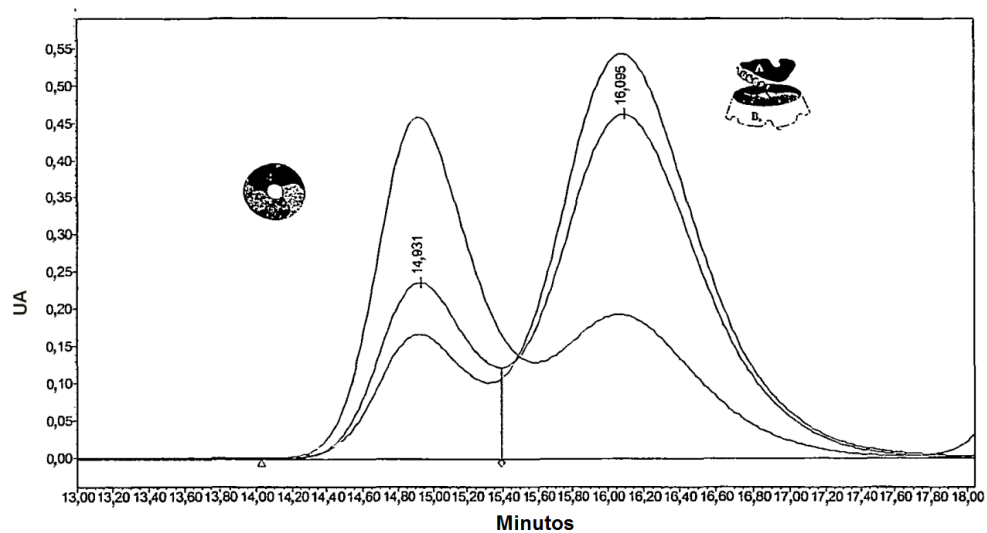
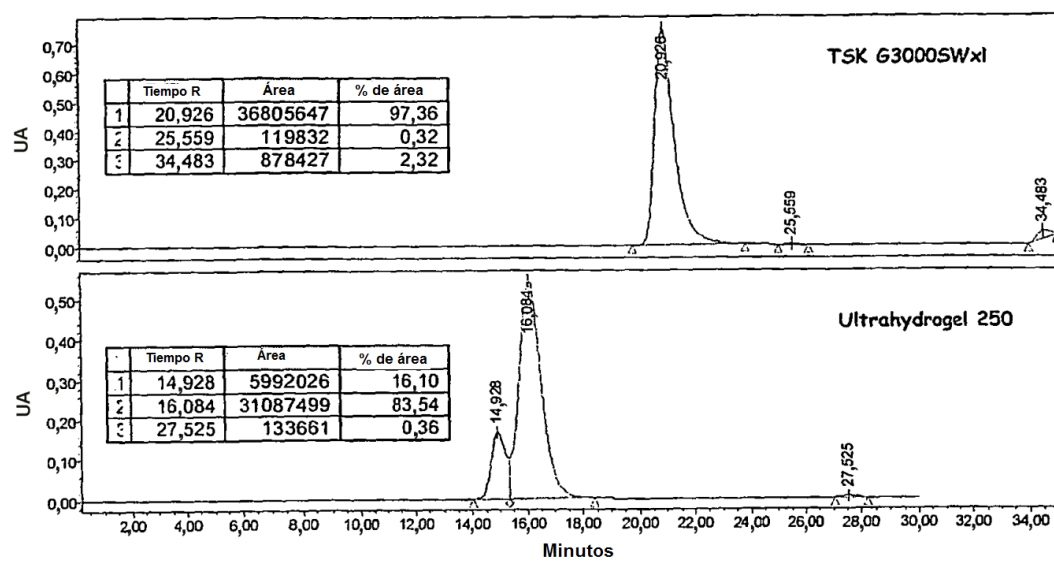


Figura 1D



Figuras 2A-2D

	Número de muestra	Fecha de adquisición	Eluyente	Volumen de inyección	Canal	Dilución
1	PBS 5 g agitación	09/04/2003 9.55.19	KPi 30 mM + Na2S04 50 mM pH 7,2	100,00	214 nm	4,00
2,	PBS 5 g agitación	08/04/2003 13.53.06	KPi 100 mM + Na2S04 100 mM pH 7,2	100,00	214 nm	4,00
3	PBS 5 g agitación	09/04/2003 15.07.11	KPi 250 mM + Na2S04 100 mM pH 7,2	100,00	214 nm	4,00
4	PBS 5 g agitación	10/04/2003 9.51.42	KPi 200 mM + Na2S04 200 mM pH 7,2	100,00	214 nm	4,00

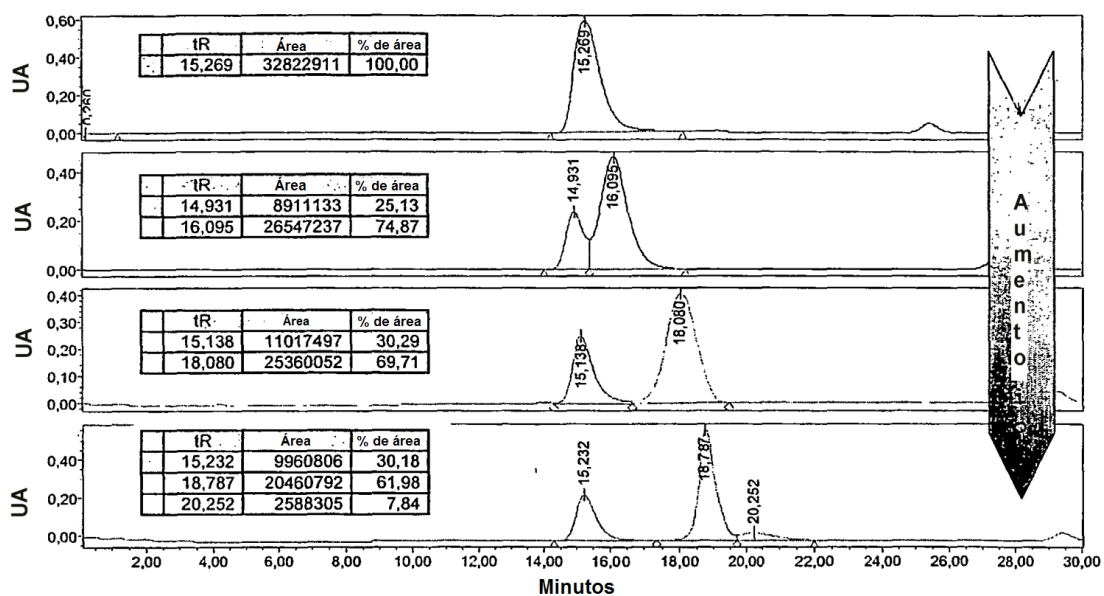


Figura 3

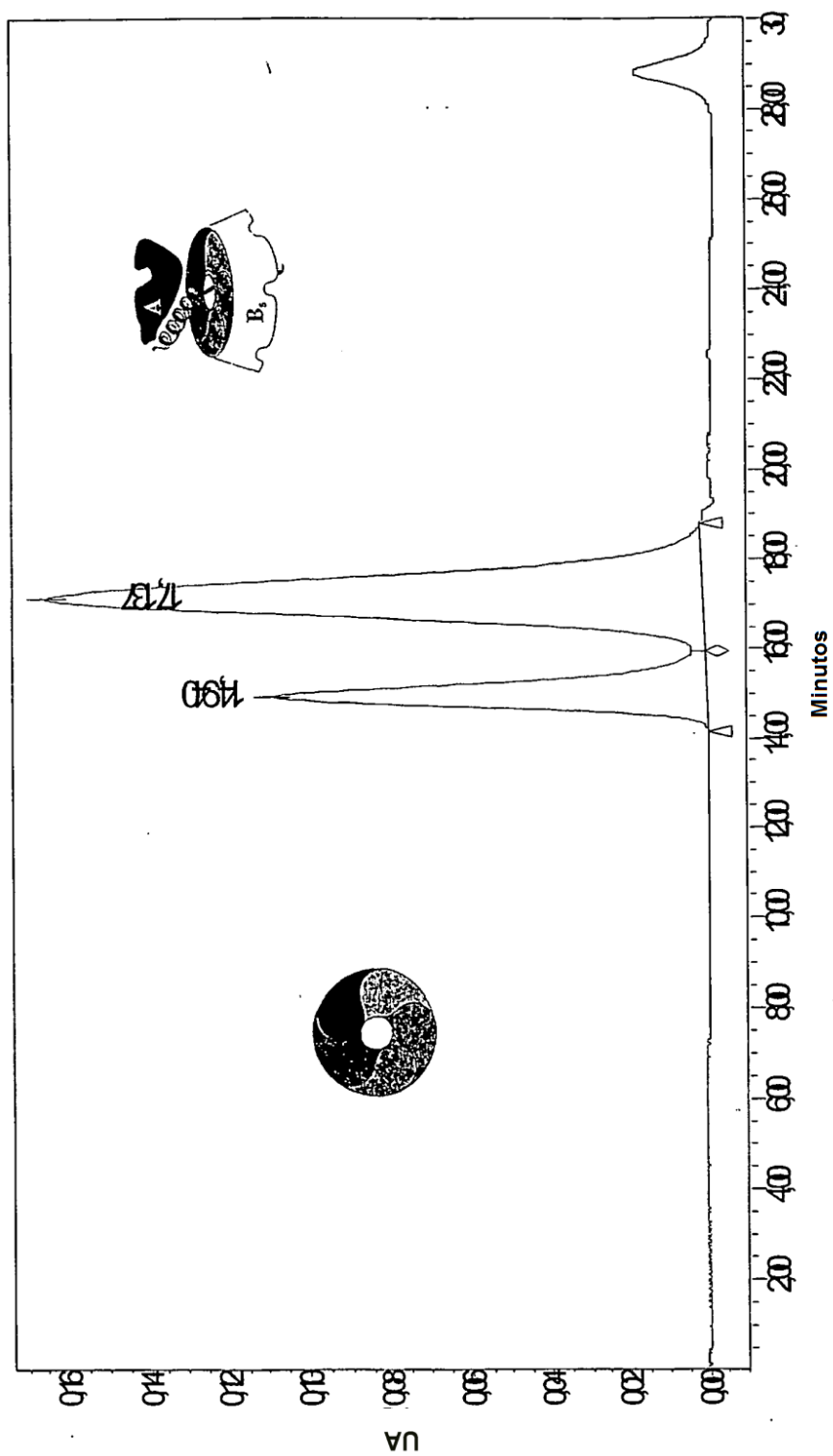


Figura 4

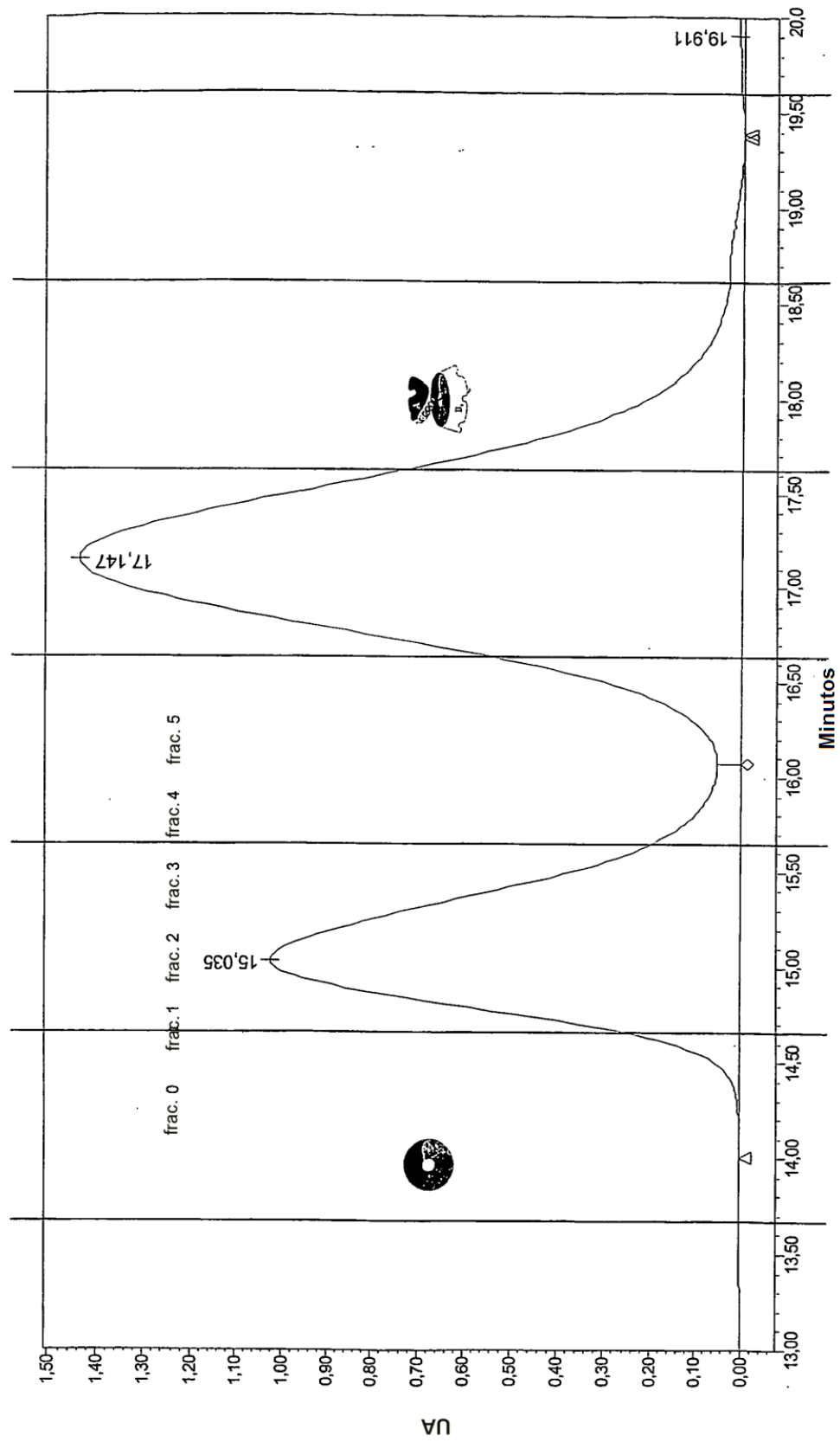


Figura 5A

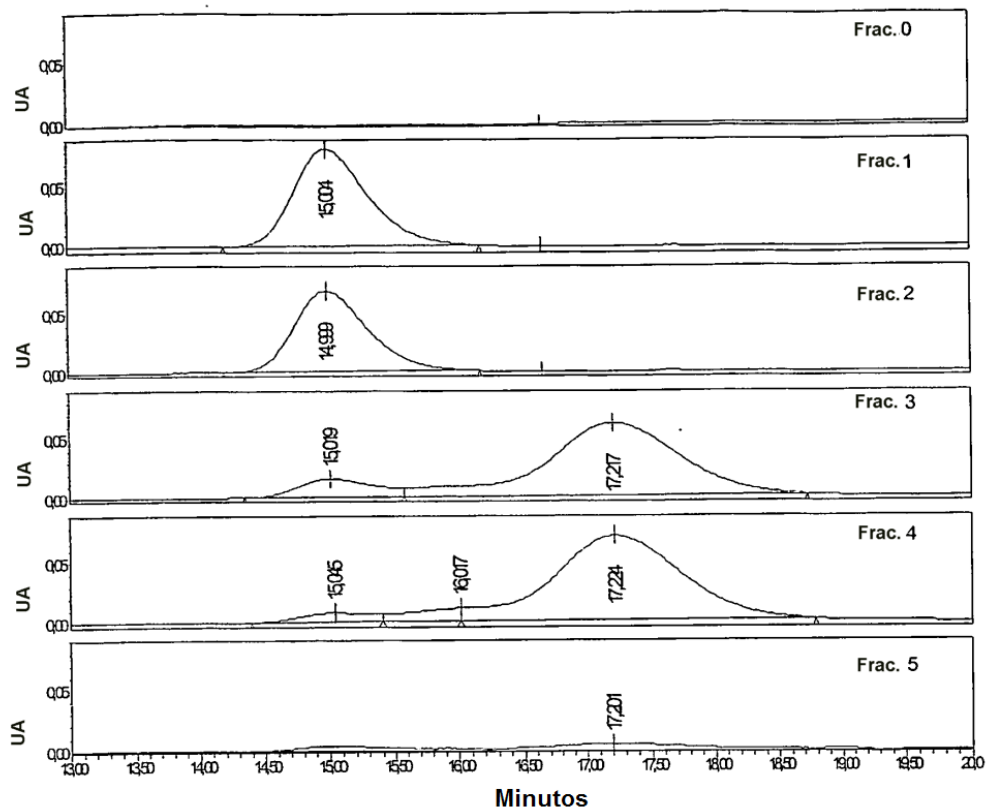


Figura 5B

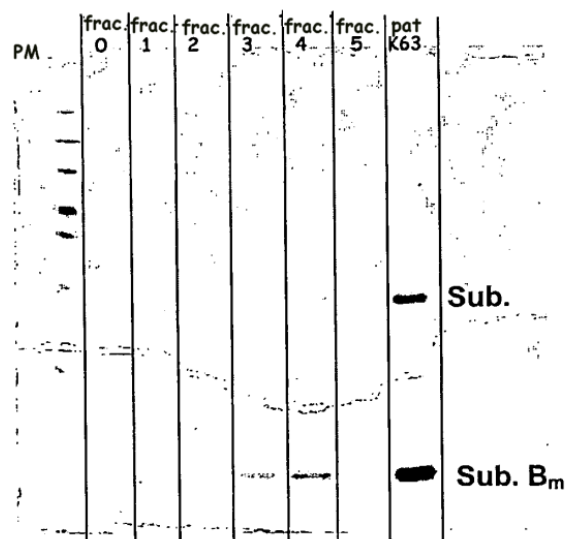


Figura 5C

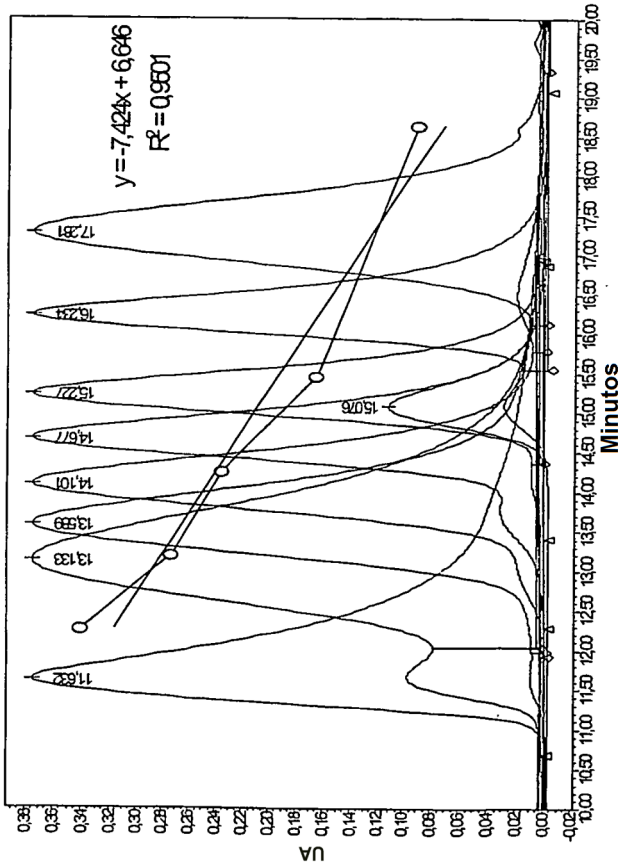


Figura 5D

Proteínas patrón	Rt(min)	P _m (Da)
Tioglobulina (bovina)	11,62	669.000
Apo ferritina	13,13	476.316
B-amilasa	13,58	224.340
Alcohol Deshidrogenasa	14,10	146.980
BSA	14,67	66.800
Anhidrasa carbónica	16,22	29.023
Proteínas de muestra	Rt(min)	P _m exp.
CRM	15,23	57.099
K63 AB ₅	17,26	9.611
K63 B ₅	15,07	65.607

Superposición de proteínas patrón, referencia CRM₁₉₇ (azul en negrita), K63 (azul en negrita), una curva de calibración usada para determinación de PM aparente.

Figura 5E

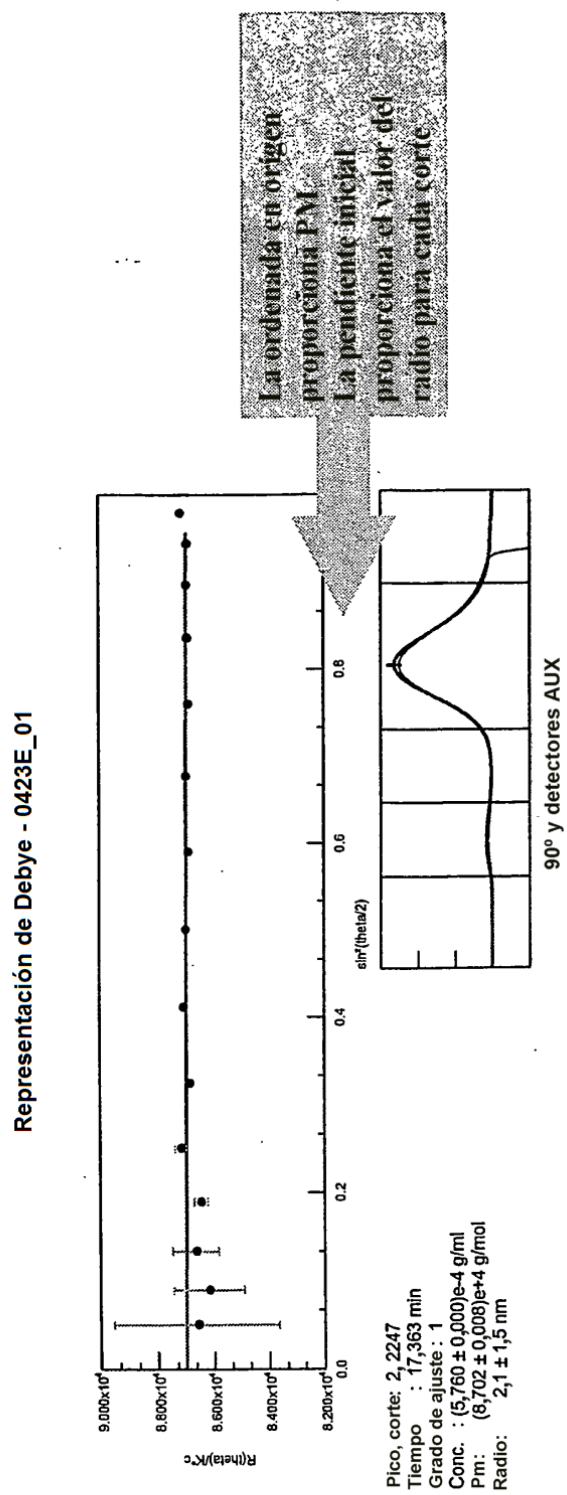


Figura 5F(a)

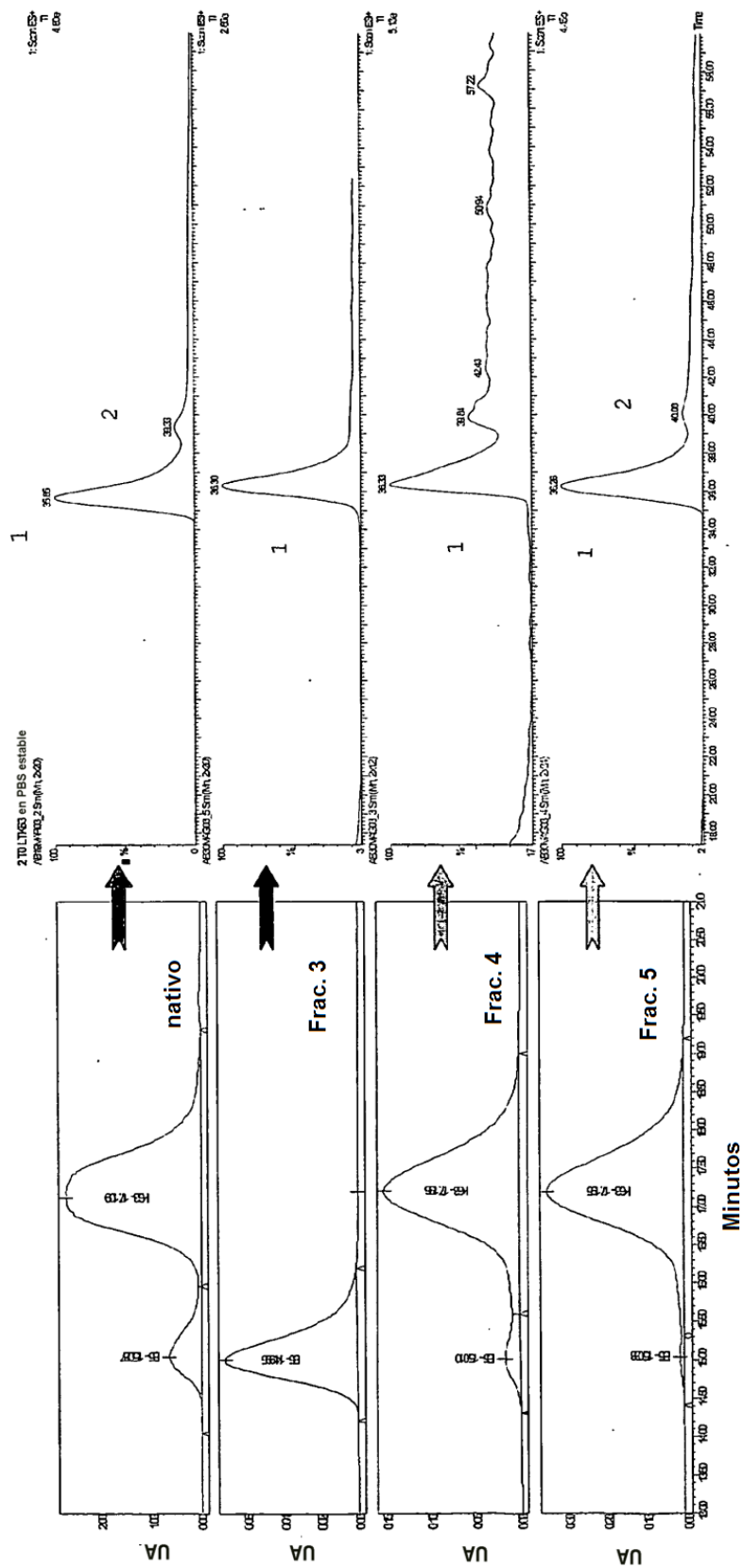


Figura 5F (b)

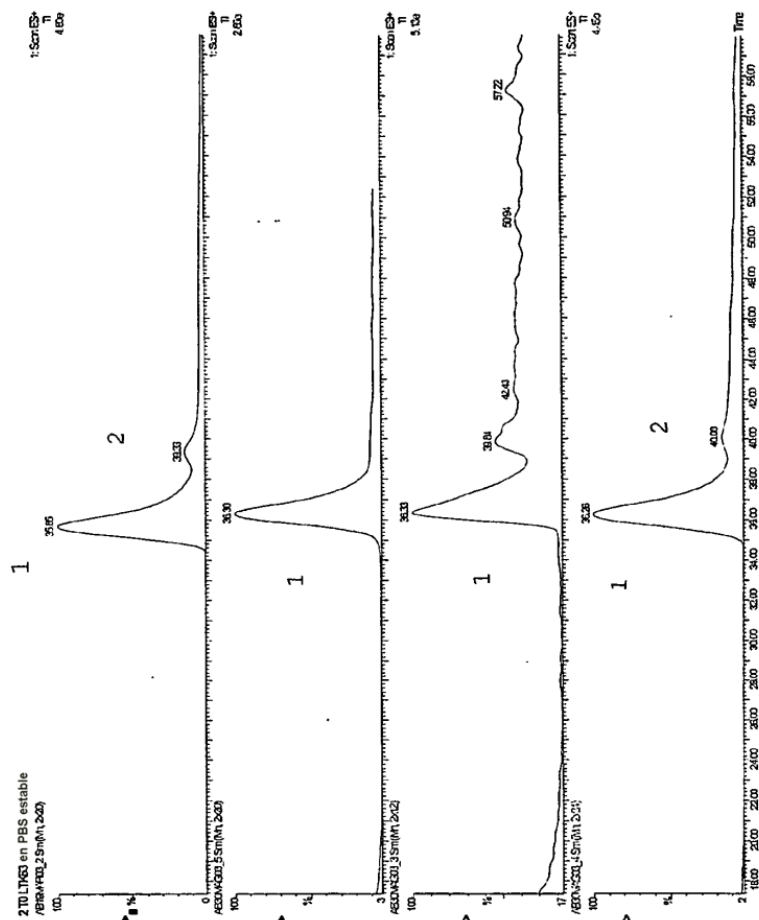


Figura 5G

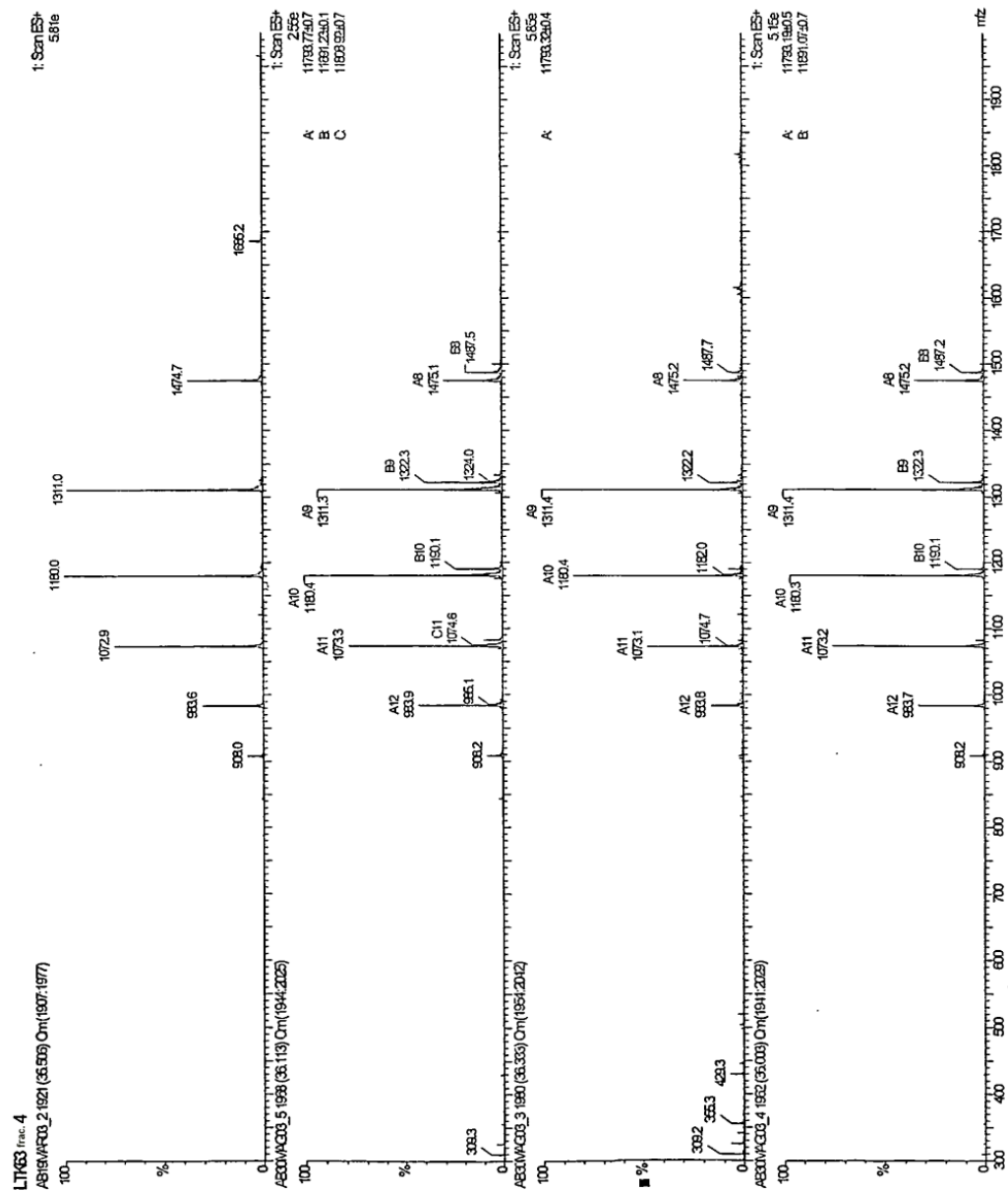


Figura 6: Análisis de SDS-PAGE de muestras agitadas de LTK63

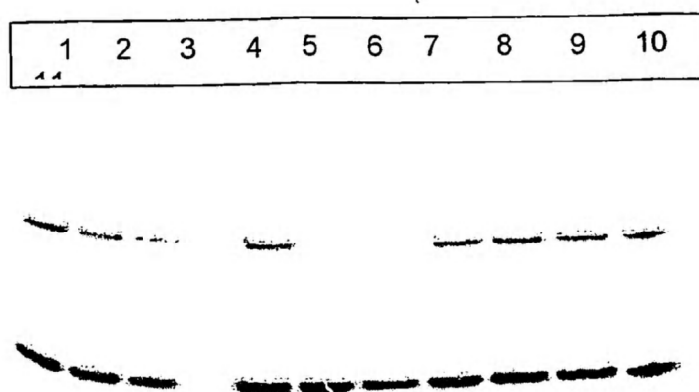


Figura 7: Análisis de SDS-PAGE de muestras de LTK63 tratadas con CHAPS

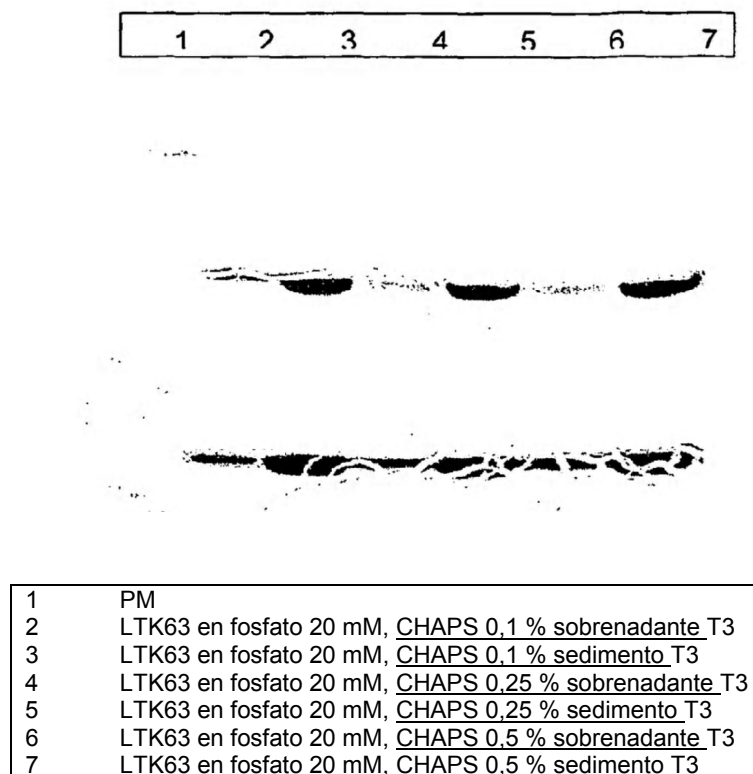
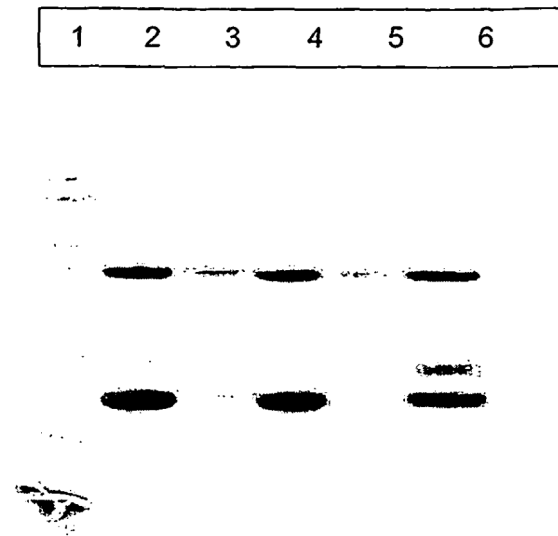


Figura 8: SDS-PAGE de muestras de LTK63 tratadas con L-arginina



1	PM
2	LTK63 2 mg/ml en fosfato 20 mM, <u>L-arginina 100 mM sobrenadante T1</u>
3	LTK63 2 mg/ml en fosfato 20 mM, <u>L-arginina 100 mM sedimento T1</u>
4	LTK63 4 mg/ml en fosfato 20 mM, <u>L-arginina 100 mM sobrenadante T1</u>
5	LTK63 4 mg/ml en fosfato 20 mM, <u>L-arginina 100 mM sedimento T1</u>

Figura 9(a): Antiguo procedimiento de HPLC para análisis de muestras tratadas con L-arginina

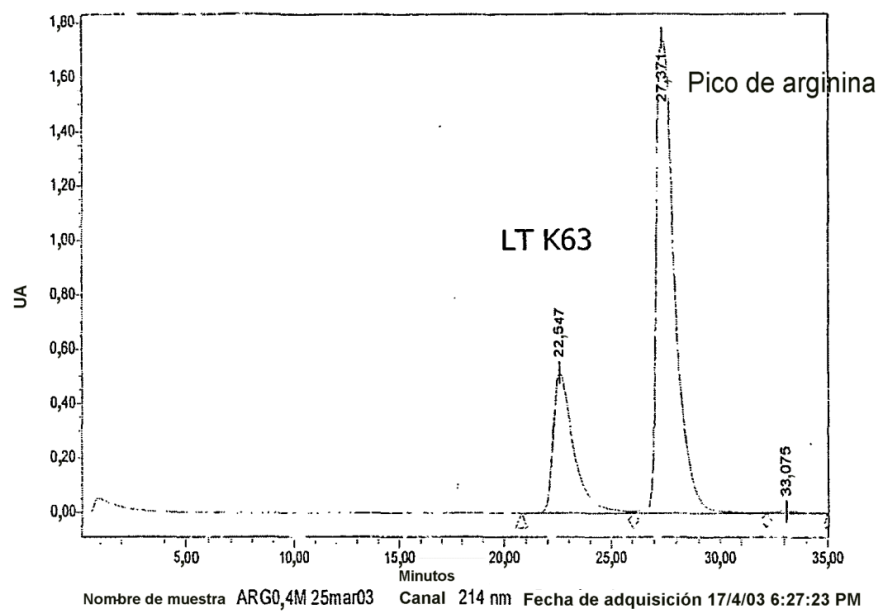


Figura 9(b): Nuevo procedimiento de HPLC para análisis de muestras tratadas con L-arginina

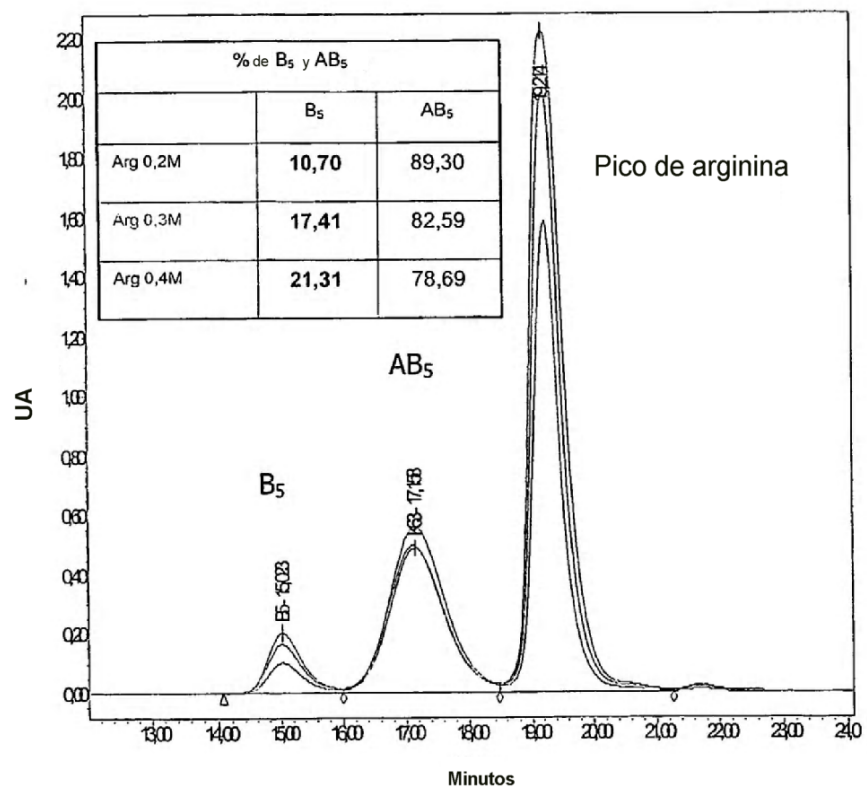


Figura 10(a): Determinación de disociación AB5 en muestras tratadas con L-arginina y el % de B5 en LTK63 a 1,3 mg/ml

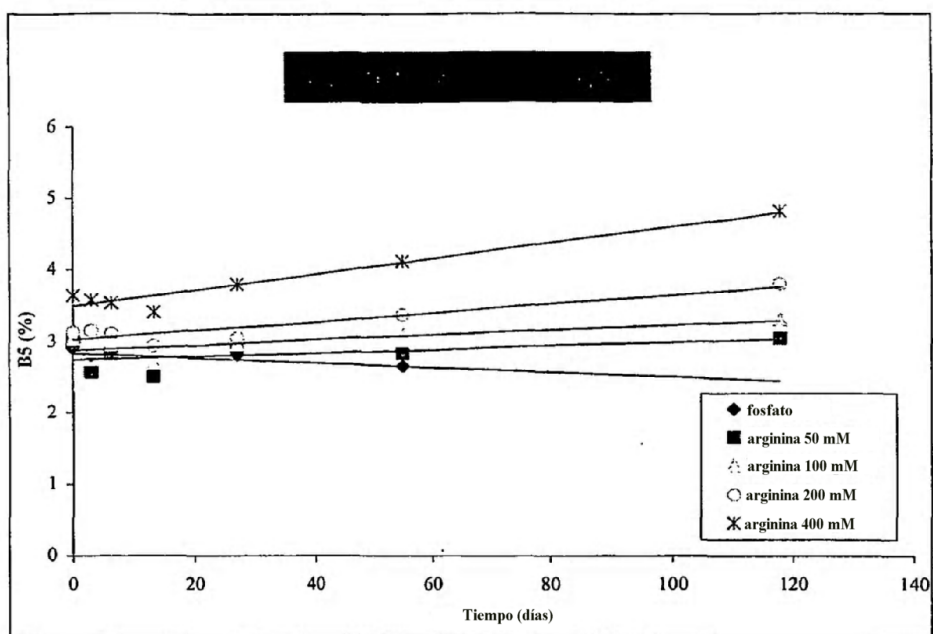


Figura 10(b): Determinación de disociación de AB5 en muestras tratadas con L-arginina y el % de B5 en LTK63 a 4,0 mg/ml

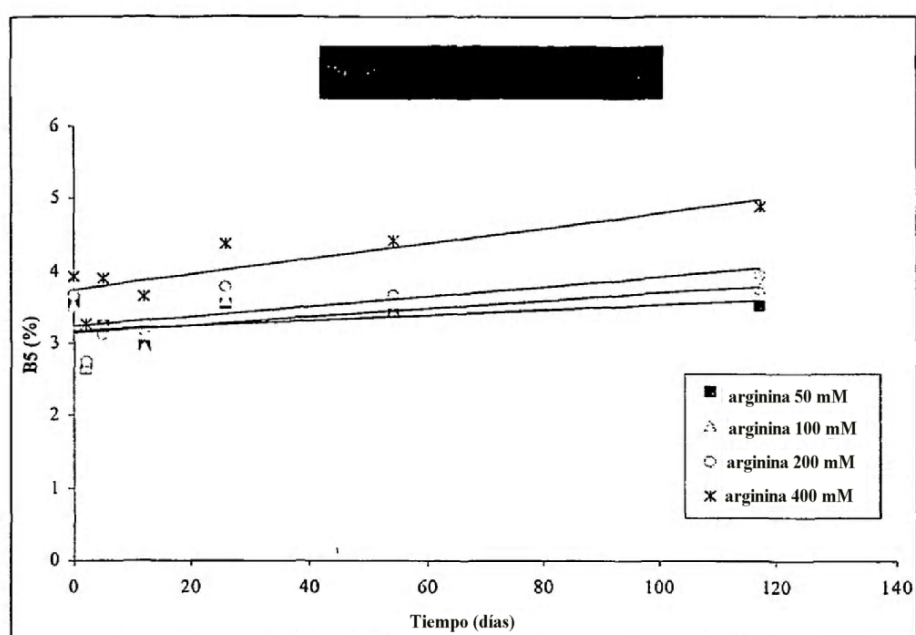


Figura 11(a): Efecto de CHAPS en la disociación de LTK63

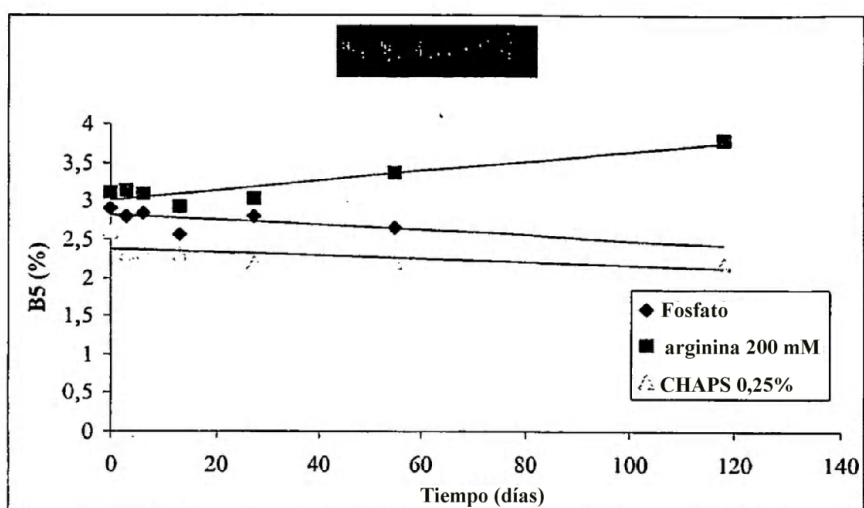


Figura 11(b): Efecto de CHAPS en la disociación de LTK63 en combinación con L-arginina

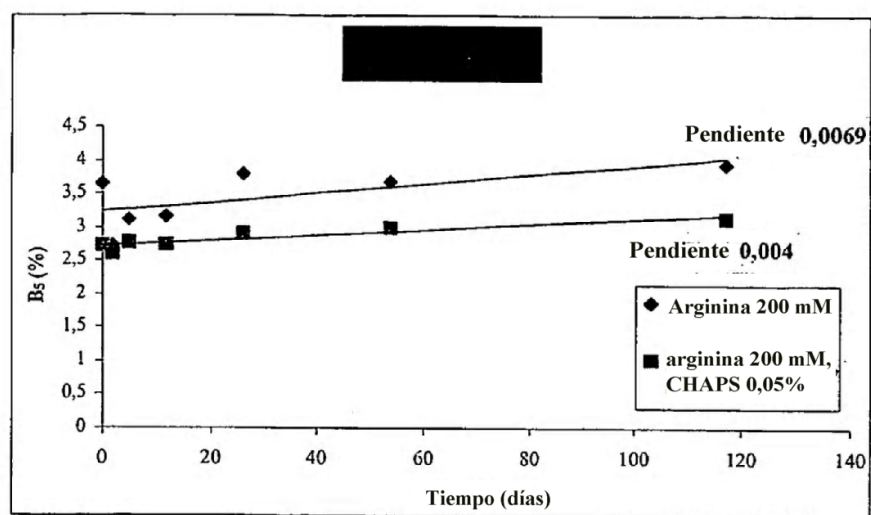


Figura 12: Efecto de L-arginina y CHAPS en la estabilidad de LTK63 a una concentración de proteínas de 1,3 mg/ml

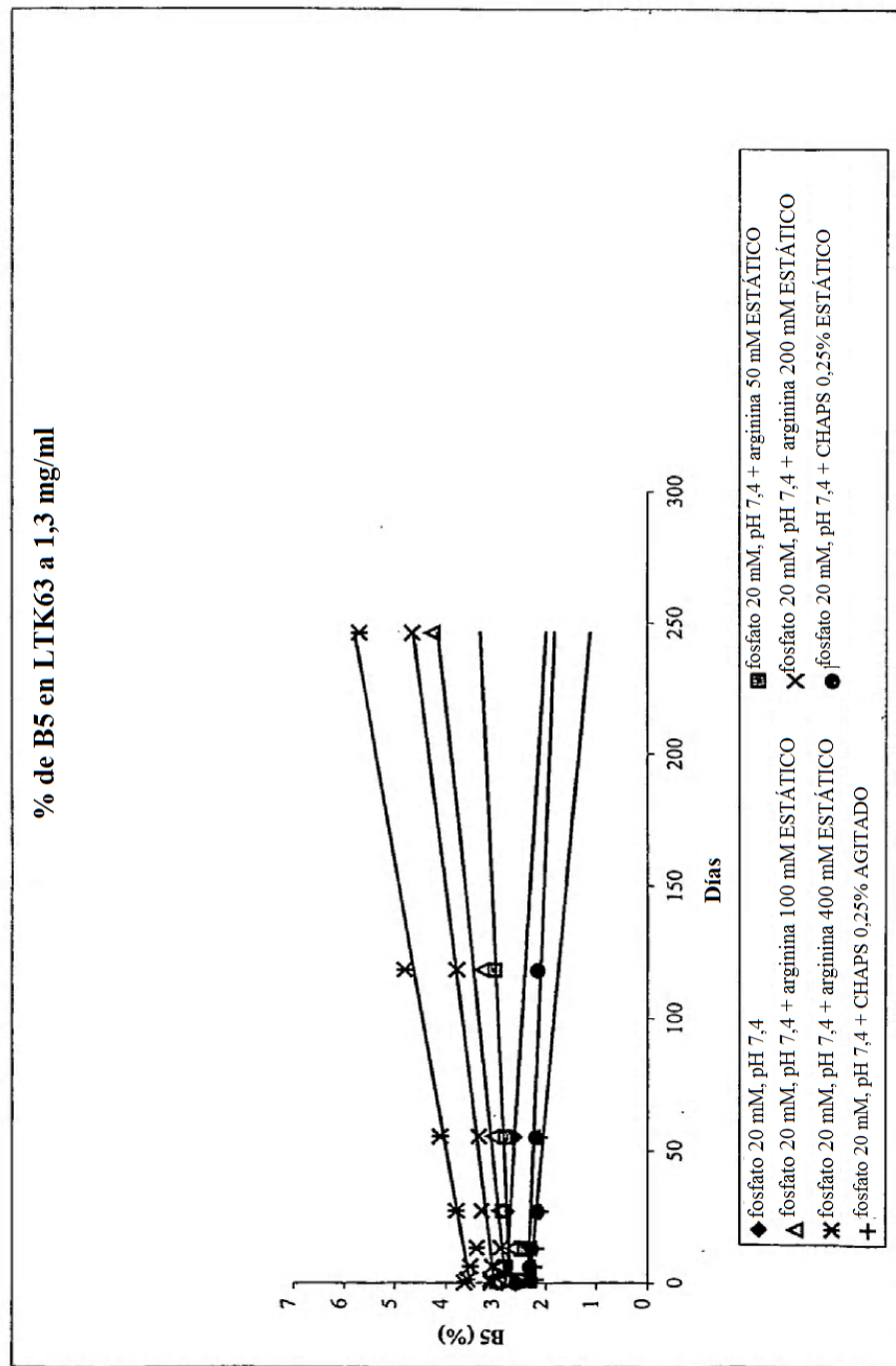
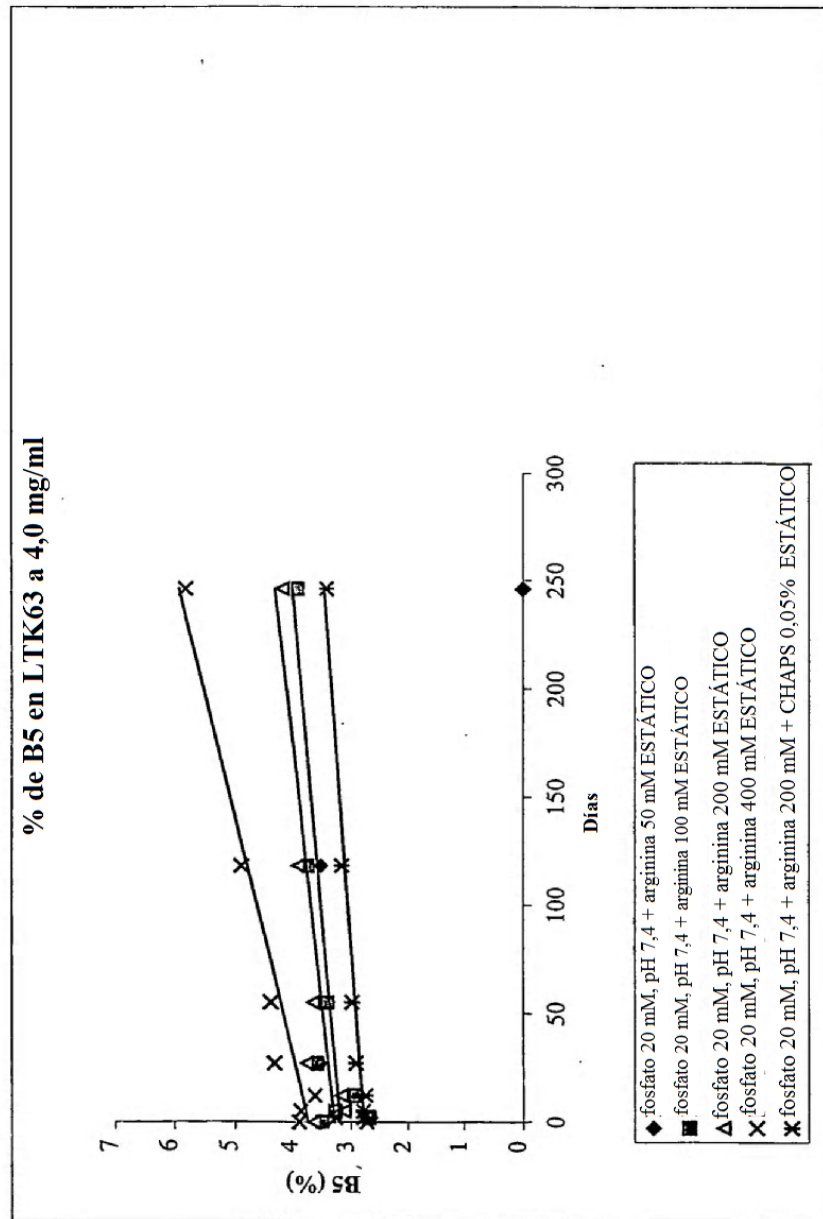


Figura 13: El efecto de L-arginina y la combinación L-arginina/CHAPS en la estabilidad de LTK63 a una concentración de proteína de 4,0 mg/ml



La Figura 14 muestra el efecto de las condiciones de almacenamiento en la estabilidad de LTK63 en tampones que contienen L-arginina + CHAPS

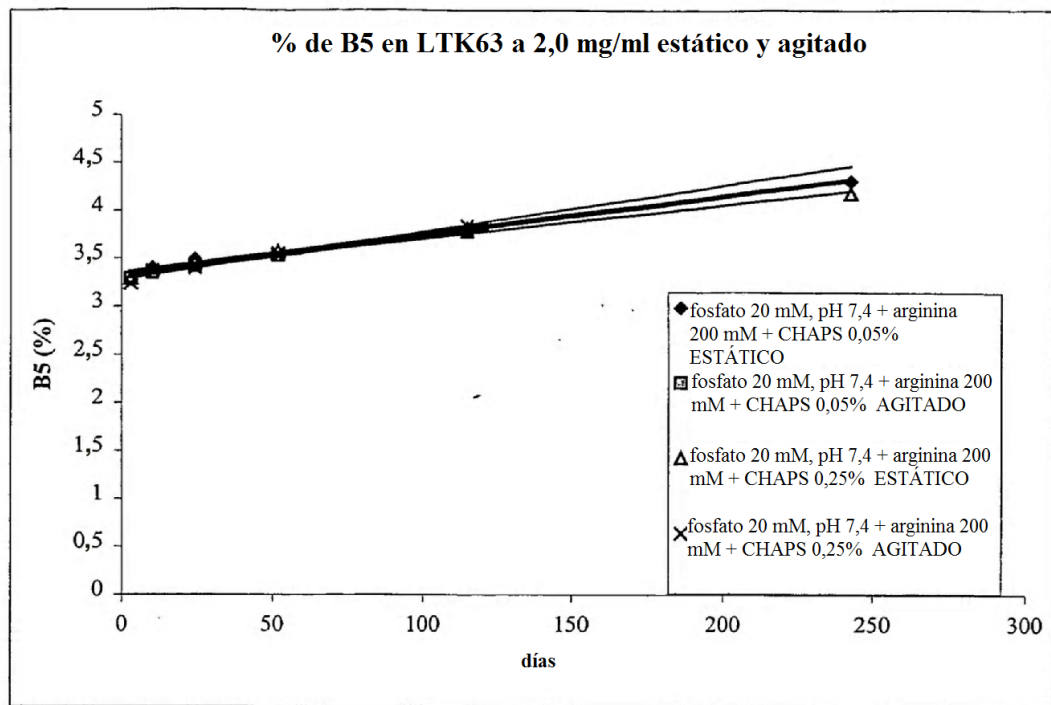


Figura 15: Comparación de la estabilidad de LTK63 en tampones de almacenamiento de L-arginina y L-arginina + CHAPS

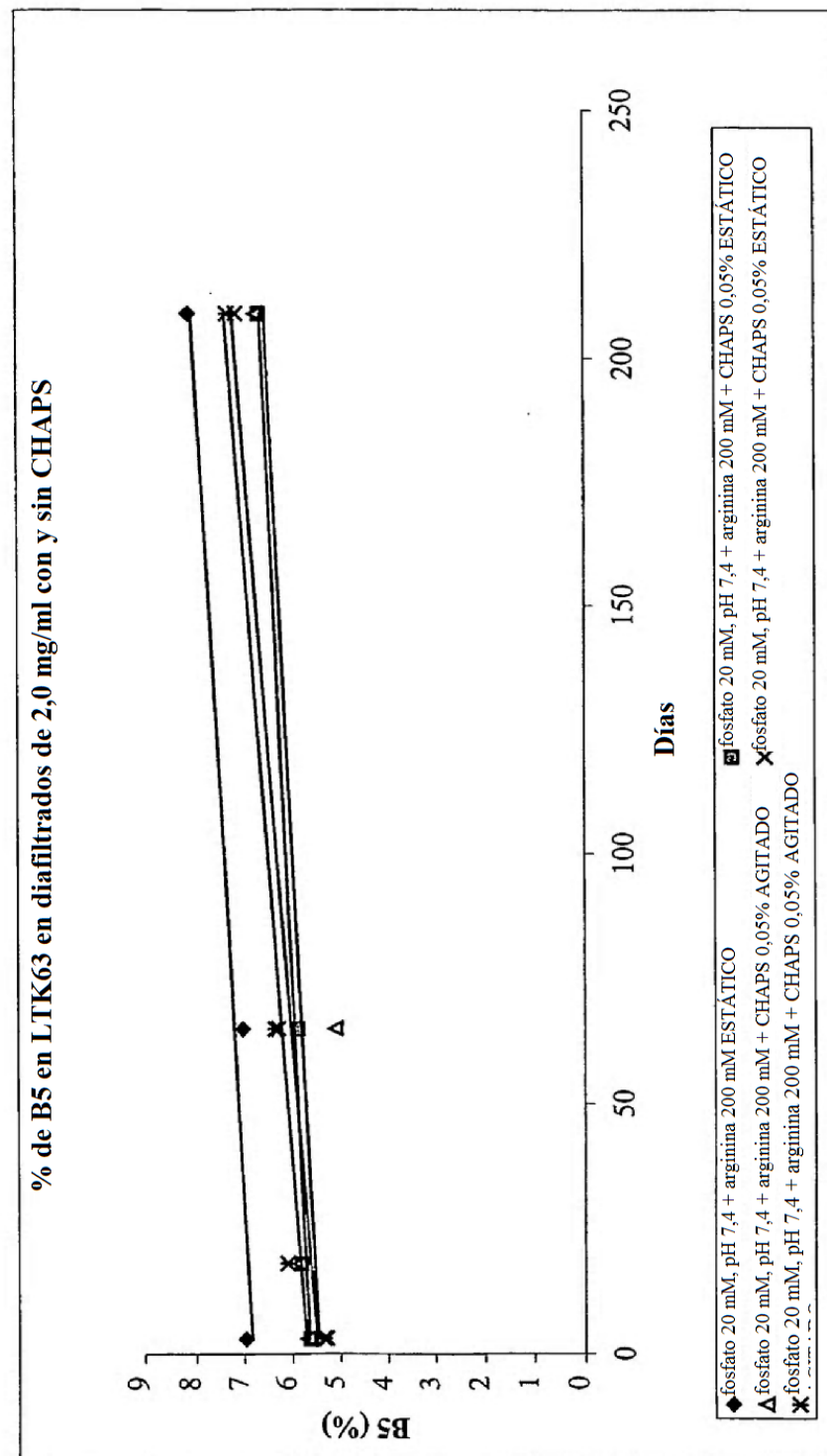


Figura 16

Tabla 2. Estructura y Clasificación de Detergentes (continuación)		
Zwittergents	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ pH ≥ 6	EMPIGEN BB® (n-dodecil-N,N-dimetilglicina)
	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3^-$	x = 7, ZWITTERGENT® 3-08 x = 9, ZWITTERGENT® 3-10 x = 11, ZWITTERGENT® 3-12 x = 13, ZWITTERGENT® 3-14 x = 15, ZWITTERGENT® 3-16
		x = H, CHAPS x = OH, CHAPSO

Figura 17

Detergentes zwitteriónicos

Producto	Cat. N°	P. M. _n (anhidro)	CMC ^b (mM)	N° de agregación	Peso micelar medio	Tamaño
ASB-14	182750	434,7	—	—	—	5g, 25 g
ASB-16	182755	462,7	—	—	—	5g, 25 g
CHAPS	220201	614,9	6-10	4-14	6000	1 g 5 g 10 g 25 g
CHAPSO	220202	630,9	8	11	7000	1 g 5 g
DDMAB	252000	299,5	4,3	—	—	5 g
DDMAU	252005	397,7	0,13	—	—	5 g
Detergente EMPIGEN BB® solución 30%	324650	272,0	1,6-2,1	—	—	100 ml
Lauril dimetilaminoxido (LDAO) solución 30%	428011	329,4	1-2	76	12000	100 ml
Detergente ZWITTERGENT® 3-08	693019	279,6	330	—	—	5 g
Detergente ZWITTERGENT® 3-10	693021	307,6	25-40	41	12500	5 g 25 g
Detergente ZWITTERGENT® 3-12	693015	335,6	2-4	55	18500	5 g 25 g
Detergente ZWITTERGENT® 3-14	693017	363,6	0,1-0,4	83	30000	5 g 25 g 100 g
Detergente ZWITTERGENT® 3-16	693023	391,6	0,01-0,06	155	60000	5 g 25 g

a. Los pesos moleculares medios se proporcionan para detergentes compuestos de mezclas de longitudes de cadena; b. Temperatura: 20 - 25 °C

MARCAS COMERCIALES

BRIJ® y TWEEN® son marcas comerciales registradas de ICI, Americas, Inc.	LUBROL® es una marca comercial registrada de Imperial Chemical Inc.
EMPIGEN BB® es una marca comercial registrada de Allbright & Wilson.	PLURONIC® es una marca comercial registrada de Wyandotte Chemicals Corporation.
GENAPOL® es una marca comercial registrada de Hoechst AG.	TRITON X® es una marca comercial registrada de Rohm y Haas.
ULTROL®, PROTEIN GRADE® Y ZWITTERGENT® son marcas comerciales registradas de Calbiochem-Novabiochem Corporation.	
Adsorbente CÁLBIOSORB™ y detergente ÉLUGENT™ son marcas comerciales de Calbiochem-Novabiochem Corporation	