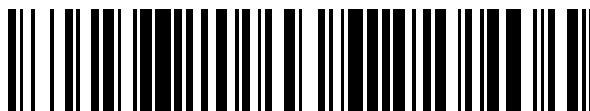


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 735**

51 Int. Cl.:

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61M 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2008 E 10164045 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 2237038**

54 Título: **Artículos médicos revestidos con organopolisiloxano que contienen una disolución de proteína y un tensioactivo no iónico**

30 Prioridad:

22.10.2007 US 999920 P

25.06.2008 WO PCT/US2008/068136

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

21.08.2015

73 Titular/es:

BECTON DICKINSON AND COMPANY (50.0%)
One Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417, US y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
COLORADO (50.0%)

72 Inventor/es:

TROTTER, JOSEPH T.;
HAMEL, JEAN-BERNARD;
CARPENTER, JOHN FRANK;
RANDOLPH, THEODORE y
GABRIELSON, JOHN PAUL

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 543 735 T3

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

DESCRIPCIÓN

Artículos médicos revestidos con organopolisiloxano que contienen una disolución de proteína y un tensioactivo no iónico

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la Invención

10

Esta invención se refiere a componentes médicos que tienen superficies revestidas con organopolisiloxano(s) y que contienen suspensiones de materiales proteínicos.

Descripción de la Técnica Relacionada

15

Las proteínas terapéuticas proporcionan numerosos tratamientos únicos y críticos para enfermedades y trastornos, tales como diabetes, cáncer, hemofilia, artritis reumatoide, esclerosis múltiple e infarto de miocardio. Ya hay docenas de productos de proteína en el mercado y más de cientos están en desarrollo preclínico y clínico. Además, con la aparición reciente de métodos fuertes para “humanizar” anticuerpos, ha habido un nuevo resurgimiento en el desarrollo de producto biotecnológico debido al tremendo aumento en el número de productos anticuerpo a investigar para tratamientos de enfermedad humana. Con los modernos enfoques genómicos y proteómicos, diariamente se están descubriendo nuevas terapias con proteína más seguras y eficaces. Sin embargo, si no se puede estabilizar adecuadamente un producto de proteína, nunca se alcanzará su beneficio para la salud humana. La vida en almacenamiento requerida para la viabilidad económica de un típico producto farmacéutico de proteína es de 18-24 meses. Alcanzar este objetivo es particularmente difícil debido a la relativamente baja estabilidad termodinámica de la proteína en su estado nativo. La actividad de una proteína depende de su estructura tridimensional nativa. Además, las proteínas son altamente susceptibles a la formación de agregados y precipitados no nativos, incluso bajo condiciones que termodinámicamente favorecen mucho el estado nativo frente al estado desplegado (por ejemplo, pH neutro a 37°C). La actividad biológica de una proteína en un agregado normalmente está muy reducida. Aún más importante, los agregados de proteína no nativa pueden causar reacciones adversas en los pacientes, tales como respuesta inmune o choque anafiláctico. La capacidad de los agregados de una proteína dada para inducir respuestas adversas no se puede predecir; ni se puede determinar el máximo nivel de agregados requeridos para la seguridad sin ensayos clínicos costosos y que requieren mucho tiempo.

20

25

30

Por tanto, un objetivo principal de la ciencia de formulación (“formulation science”) es diseñar una formulación en la cual la agregación se mantiene a un nivel extremadamente bajo. Generalmente, el objetivo es tener no más de 1-2% de la población entera de proteína formando agregados durante la vida en almacenamiento del producto. Incluso bajo condiciones de disolución donde la estabilidad física de proteína parece optimizarse para minimizar la agregación de proteína en la disolución madre, puede haber formación de partículas de proteína visibles y subvisibles que pueden constituir solamente una fracción mínima de la población total de proteína. La presencia de incluso un pequeño número de partículas de proteína puede volver un producto clínicamente inaceptable. Los particulados de proteína son particularmente inmunogénicos. Aunque los particulados son deseables para las formulaciones de vacuna (donde las moléculas de proteína están unidas a partículas de sales de aluminio), en un producto de proteína terapéutico, la respuesta inmune a tales partículas pueden causar respuestas adversas severas en pacientes. Por tanto, aunque la masa de proteína que se agrega pueda ser tan pequeña como para tener esencialmente no efecto perjudicial sobre la potencia del producto, la seguridad puede estar muy comprometida.

35

40

45

La formación de partícula puede ocurrir rutinariamente durante las etapas de tratamiento tales como el bombeo de la disolución de proteína durante el llenado del vial/jeringuilla. En otros casos, la formación de partícula puede parecer ser al azar. Por ejemplo, las partículas se pueden ver en una pequeña parte de viales o jeringuillas prellenadas en un lote de producto dado. Otras veces, un producto llenado en un lote dado de viales o jeringuillas puede formar partículas de proteína en una gran parte de los recipientes. Desafortunadamente, estas partículas aparecen después de las etapas de filtración estéril y no se pueden extraer por filtración durante la inyección subcutánea, intradérmica o intramuscular.

50

Los aceites de silicona comúnmente se usan como lubricantes en artículos médicos. Mientras que los aceites de silicona no se someten a oxidación, migración y pegado podría ocurrir para jeringuillas prellenadas, y las altas fuerzas iniciales (“breakout”) y/o axiales (“breakloose”) serían un problema. El aceite de silicona ha demostrado bajo ciertas condiciones, incluso a baja concentraciones, que induce la agregación de proteína. Diversos productos de proteína acuosos nuevamente comercializados, incluyendo eritropoyetinas (por ejemplo, Recormon™ y Epnex™), interferones (por ejemplo, Avonex™ y Rebif™) y terapias de artritis reumatoide (por ejemplo, Enbrel™ y Humira™) son producidos en jeringuillas prellenadas. Las superficies internas de las jeringuillas prellenadas están revestidas con aceite de silicona para mejorar la funcionalidad de la jeringuilla, y por consiguiente, la proteína formulada está expuesta a superficies con aceite de silicona. La agregación de proteína terapéutica inducida por aceite de silicona es una preocupación en la industria farmacéutica, conduciendo potencialmente a la pérdida de producto y a costes de producción aumentados.

55

60

Hay una necesidad de artículos médicos que superen los problemas anteriormente mencionados.

5 El documento EP-A-1811297 se refiere a sistemas de ensayo para polipéptidos respecto a silicona, en particular, sistemas de ensayo para identificar y analizar polipéptidos que se adhieren a silicona.

10 Los documentos US-A-2005/074451 y US-A1-2005/065192 se refieren a métodos y composiciones para tratar la artritis reumatoide mediante la administración de una terapia de combinación que comprende metotrexato y un anticuerpo a integrina alfa-4 o un fragmento de unión a antígeno inmunológicamente activo en cantidades terapéuticamente eficaces. Además se refieren a métodos de preparación de los compuestos y métodos de uso de los compuestos y composiciones.

15 El documento WO-A-03/007868 se refiere al almacenamiento de composiciones farmacéuticas líquidas, particularmente composiciones parenterales inyectables, en recipientes de vidrio de tal manera que su contenido de aluminio no supere límites aceptables durante el periodo de almacenamiento y/o por lo cual el nivel de los particulados contenidos en el mismo se mantiene a un mínimo.

20 Los documentos US-B1-6461334 y WO-A-99/44755 se refieren a artículos médicos para contener una preparación de proteína farmacéutica que comprenden al menos un primer componente y un segundo componente, que tienen al menos una superficie revestida con un revestimiento para reducir la fricción entre los dos componentes y reducir la adsorción de proteína al revestimiento.

25 Los documentos US-A1-2002/037401 y WO-A-99/44754 se refieren a sistemas de revestimiento, en particular a sistemas de revestimiento para artículos donde los materiales de plástico se deslizan contra los materiales de caucho flexibles, en los que los revestimientos descritos son particularmente útiles para revestir recipientes para almacenamiento y administración de disoluciones líquidas de proteína, tales como las formulaciones de insulina.

30 El documento EP-A-0982041 describe revestimientos en los que los biopolímeros pueden unirse covalentemente a un sustrato. Tales biopolímeros incluyen aquellos que imparten tromborresistencia y/o biocompatibilidad al sustrato, lo cual puede ser un recurso médico.

35 El documento WO-A-97/17610 describe un método que se ha desarrollado para la marcación de anticuerpos con un tinte fluorescente en el que el anticuerpo primero se une a un antígeno inmovilizado y se marca con el tinte. El tinte no unido se extrae y el anticuerpo finalmente se eluye del antígeno.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un artículo médico, que comprende:

40 (a) un recipiente que comprende una cámara para recibir una disolución, en el que la superficie interna de la cámara tiene un revestimiento sobre la misma preparado a partir de una composición que comprende un organopolisiloxano que tiene una viscosidad que oscila entre 10^{-4} y $1 \text{ m}^2/\text{s}$ (100 y 1.000.000 centistokes) antes del curado; y

(b) una disolución que comprende:

45 (i) al menos una material proteínico que comprende un anticuerpo monoclonal, Factor Estimulador de Colonia de Granulocito, eritropoyetina, interferón y/o aquellos para la terapia de artritis reumatoide; y
 (ii) al menos un tensioactivo no iónico; y
 (iii) al menos un azúcar, en la que el azúcar se selecciona entre el grupo que consiste en
 50 monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y sus mezclas.

Las realizaciones preferidas son aparentes a partir de las reivindicaciones dependientes.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

55 La presente invención se entenderá mejor a partir de la siguiente descripción de las realizaciones específicas cuando se lean en conexión con los dibujos acompañantes:

La Figura 1A es un diagrama de la adsorción/agregación de mAb con aceite de silicona en función del tiempo para una formulación que incluye sacarosa, mAb y aceite de silicona y una formulación que incluye mAb y
 60 aceite de silicona;

La Figura 1B es un diagrama de la adsorción/agregación de mAb con aceite de silicona en función del tiempo para una formulación que incluye sacarosa, mAb y aceite de silicona y una formulación que incluye sacarosa, tensioactivo no iónico, mAb y aceite de silicona de acuerdo con la presente invención;

- La Figura 2A es un diagrama de dispersión de intensidad de fluorescencia de la intensidad FL1 y la intensidad FL2 para una formulación control sin sacarosa o tensioactivo;
- La Figura 2B es un diagrama de dispersión de intensidad de fluorescencia de la intensidad FL1 y la intensidad FL2 para una formulación con sacarosa;
- 5 La Figura 2C es un diagrama de dispersión de intensidad de fluorescencia de la intensidad FL1 y la intensidad FL2 para una formulación con tensioactivo no iónico;
- La Figura 2D es un diagrama de dispersión de intensidad de fluorescencia de la intensidad FL1 y la intensidad FL2 para una formulación con sacarosa y tensioactivo no iónico de acuerdo con la presente invención;
- 10 La Figura 3A es un diagrama de dispersión de la dispersión de luz lateral (dispersión de luz a 90°) frente a la dispersión de luz frontal (dispersión de luz a 180°) de gotitas de aceite de silicona para una formulación control sin sacarosa o tensioactivo;
- La Figura 3B es un diagrama de dispersión de la dispersión de luz lateral (dispersión de luz a 90°) frente a la dispersión de luz frontal (dispersión de luz a 180°) de gotitas de aceite de silicona para una formulación con sacarosa;
- 15 La Figura 3C es un diagrama de dispersión de la dispersión de luz lateral (dispersión de luz a 90°) frente a la dispersión de luz frontal (dispersión de luz a 180°) de gotitas de aceite de silicona para una formulación con tensioactivo no iónico;
- La Figura 3D es un diagrama de dispersión de la dispersión de luz lateral (dispersión de luz a 90°) frente a la dispersión de luz frontal (dispersión de luz a 180°) de gotitas de aceite de silicona para una formulación con tensioactivo no iónico de acuerdo con la presente invención;
- 20 La Figura 4A es un diagrama del oscurecimiento de la luz en función del tiempo para una formulación que incluye sacarosa, mAb y aceite de silicona y una formulación que incluye mAb y aceite de silicona;
- La Figura 4B es un diagrama del oscurecimiento de la luz en función del tiempo para una formulación que incluye sacarosa, mAb y aceite de silicona y una formulación que incluye sacarosa, tensioactivo no iónico, mAb y aceite de silicona de acuerdo con la presente invención;
- 25 La Figura 5A es un diagrama de la adsorción/agregación de mAb con aceite de silicona en función del tiempo para una formulación que incluye sacarosa, mAb y aceite de silicona y una formulación que incluye mAb y aceite de silicona;
- 30 La Figura 5B es un diagrama de la adsorción/agregación de mAb con aceite de silicona en función del tiempo para una formulación que incluye sacarosa, mAb y aceite de silicona y una formulación que incluye sacarosa, tensioactivo no iónico, mAb y aceite de silicona;
- La Figura 6 es una representación hipotética de la distribución del aglomerado y la gotita de aceite de silicona basada en la dispersión de luz lateral y frontal;
- 35 La Figura 7 es un diagrama del oscurecimiento de la luz en función del tiempo para las formulaciones de emulsión de aceite de silicona para tres diferentes viscosidades de aceite de silicona;
- La Figura 8 es un diagrama de dispersión de la dispersión de luz lateral (dispersión de luz a 90°C) frente a la dispersión de luz frontal (dispersión de luz a 180°) de gotitas de aceite de silicona para una formulación preparada a partir de aceite de silicona de $10^{-3} \text{ m}^2/\text{s}$ (1.000 cSt);
- 40 La Figura 9 es un diagrama de dispersión de la dispersión de luz lateral (dispersión de luz a 90°C) frente a la dispersión de luz frontal (dispersión de luz a 180°) de gotitas de aceite de silicona para una formulación preparada a partir de aceite de silicona de $12,5 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2/\text{s}$ (12.500 cSt);
- La Figura 10 es un diagrama de flujo de un método para la preparación y análisis de muestras de disoluciones de organopolisiloxano de acuerdo con la presente invención;
- 45 La Figura 11 es un diagrama de los espectros de excitación y emisión de fluorescencia normalizados en función de la longitud de onda para tinte Pacific Blue™ y tinte Rojo Nilo;
- La Figura 12A es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona no marcado;
- 50 La Figura 12B es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo;
- La Figura 12 C es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™;
- 55 La Figura 12D es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo y anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ de acuerdo con la presente invención;
- 60 La Figura 13A es un diagrama del área superficial de partícula teórico en función del volumen de partícula para un intervalo de tamaño de esferas perfectas;

La Figura 13B es un diagrama del área superficial de partícula en función del volumen de partícula para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo y anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ de acuerdo con la presente invención;

La Figura 14A es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo y anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ de acuerdo con la presente invención;

La Figura 14B es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo, anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™, y tensioactivo no iónico de monolaurato de polioxietilen 20 sorbitán Tween 20® al 0,03% de acuerdo con la presente invención;

La Figura 15A es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo y anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ de acuerdo con la presente invención;

La Figura 15B es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo, anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ y tensioactivo no iónico de monolaurato de polioxietilen 20 sorbitán Tween 20® al 0,03% de acuerdo con la presente invención;

La Figura 16A es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo y anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ de acuerdo con la presente invención;

La Figura 16B es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo, anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ y sal 150 mM de acuerdo con la presente invención;

La Figura 16C es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo, anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ y sacarosa 0,5 M de acuerdo con la presente invención;

La Figura 16D es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo, anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™, sacarosa 0,5 M, Sal 150 mM y tensioactivo no iónico de monolaurato de polioxietilen 20 sorbitán Tween 20® al 0,03% de acuerdo con la presente invención;

La Figura 17A es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo y anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ medido a una extensión de ventana de 10 μ s de acuerdo con la presente invención;

La Figura 17B es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo, anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ y tensioactivo no iónico de monolaurato de polioxietilen 20 sorbitán Tween 20® al 0,03% medida a una extensión de ventana de 10 μ s de acuerdo con la presente invención;

Figura 17C es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo y anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ medida a una extensión de ventana de 2 μ s de acuerdo con la presente invención; y

Figura 17D es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo, anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ y tensioactivo no iónico de monolaurato de polioxietilen 20 sorbitán Tween 20® al 0,03% medida a una extensión de ventana de 2 μ s de acuerdo con la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

También, se debería entender que cualquier intervalo numérico enumerado en la presente memoria pretende incluir todos los subintervalos subsumidos en el mismo. Por ejemplo, un intervalo de "1 a 10" pretende incluir todos los subintervalos entre ellos incluyendo el valor mínimo enumerado de 1 y el valor máximo enumerado de 10, es decir, que tiene un valor mínimo igual o mayor que 1 y un valor máximo igual o menor que 10.

Aunque sin estar obligados por ninguna teoría, la formación de partícula de proteína puede surgir a partir de la nucleación heterogénea de agregados de proteína sobre las superficies de nanopartículas y micropartículas de materiales extraños. Estos contaminantes particulados pueden incluir metales o silicona caídos de bombas de llenado de vial, micropartículas de tungsteno producidas durante la fabricación de jeringuillas de vidrio, y nanopartículas de vidrio caídas como resultado de los procedimientos de despirogenización a alta temperatura. En algunas realizaciones no limitantes, los métodos de la presente invención pueden ser útiles en relación con la preparación de jeringuillas prellenadas en las que las superficies están revestidas con aceite(s) de silicona u organopolisiloxano(s). El aceite de silicona es deseable para asegurar el movimiento suave y libre del tapón a través del tambor de la jeringuilla cuando se inyecta el producto. La formación de partículas de proteína en jeringuillas prellenadas tratadas con aceite de silicona, las cuales pueden sufrir nucleación mediante microgotitas de aceite de silicona, también puede ser de interés. Aunque tales partículas, y los agregados de proteína que pueden resultar de ellos, sean ubicuos, no se ha abordado virtualmente en la bibliografía la caracterización sistemática del problema y los mecanismos que la rigen. Sin esa nueva percepción, la industria continuará estando plagada de sucesos de agregación de proteína y la resultante pérdida de producto, costes aumentados y los riesgos de seguridad para pacientes.

La agregación homogénea de proteína se puede inhibir usando estabilizadores termodinámicos (por ejemplo, sacarosa) que aleja el conjunto del estado nativo de las conformaciones estructuralmente expandidas y lo acerca hacia las especies estructuralmente más compactas. Los estabilizadores tales como la sacarosa aumentan la estabilidad termodinámica de proteína porque de manera preferente son excluidos de la superficie de las moléculas de proteína. Concomitante con la exclusión preferencial es un aumento en el potencial químico de proteína. Las magnitudes de estos dos efectos son directamente proporcionales al área superficial de la proteína expuesta al disolvente y son independientes de las propiedades químicas de las cadenas laterales de los residuos expuestos. De manera preferente los solutos excluidos aumentan la barrera de energía libre entre el estado nativo más compacto y el estado completamente desplegado o especies estructuralmente expandidas dentro del conjunto de estado nativo, porque el último tiene un área superficial mayor y, de ahí, mayor aumento en el potencial químico. Por tanto, la sacarosa aleja el equilibrio de las especies competentes de agregación estructuralmente expandidas.

Además de la modulación termodinámica de la distribución de especie dentro de la población molecular de proteína, las energéticas de las interacciones proteína-proteína en disolución son determinantes importantes de las cinéticas de la agregación de proteína. El desplegamiento parcial de una proteína no es suficiente, por sí misma, para causar agregación. También debe seguir una reacción de ensamblaje, en la que dos o más moléculas de proteína se agregan. Las cinéticas de este proceso están moduladas por las energías intermoleculares proteína-proteína, las cuales pueden ser alteradas de una en una al cambiar las condiciones de disolución. Tal estabilidad "coloidal" puede estar relacionada con el segundo coeficiente vírico osmótico, B22. Este parámetro está muy afectado por las interacciones carga-carga entre moléculas de proteína. Por consiguiente, los cambios en el pH y la fuerza iónica de la disolución alteran las interacciones proteína-proteína.

El área superficial del material proteínico adherido a la superficie de una partícula de organopolisiloxano se puede estimar usando un modelo teórico de una gotita perfecta que tiene un área superficial igual a volumen^{2/3} de partícula. Véase J.H. Jett et al., "Quantitation of Cell Surface Antigen Density by Flow Cytometry", 4º Simposio Anual de Citometría de Flujo, Voss, Norway (4 de Junio, 1979)(publicado 1 de Enero, 1979)(Resumen). La confirmación de la detección de proteína fluorescentemente marcada asociada a la superficie del organopolisiloxano fluorescentemente marcado en presencia de un ruido de fondo óptico ("optical background") se infiere por la pendiente de las mediciones correlacionadas, la cual está cerca del teórico de diez elevado a dos tercios ($10^{2/3}$) para el área superficial en función del volumen con esferas perfectas.

En algunas realizaciones no limitantes, la presente invención proporciona un método para evaluar la agregación de un material proteínico en una suspensión que comprende un organopolisiloxano, que comprende: (a) proporcionar una suspensión acuosa (o emulsión) de un organopolisiloxano fluorescentemente marcado y un material proteínico fluorescentemente marcado; (b) medir la intensidad de fluorescencia de partícula relativa del organopolisiloxano fluorescentemente marcado y el material proteínico fluorescentemente marcado usando clasificación de partícula activada por fluorescencia; y (c) comparar la intensidad relativa del organopolisiloxano fluorescentemente marcado con la intensidad relativa del material proteínico fluorescentemente marcado.

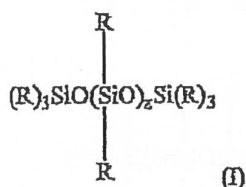
Tal como se usa en la presente memoria, "material proteínico" quiere decir un material que comprende al menos una proteína. Tal como se usa en la presente memoria, una "proteína" es un compuesto orgánico grande que comprende aminoácidos ordenados en un cadena lineal y unidos mediante enlaces peptídicos entre el carboxilo y los grupos amino de residuos de aminoácidos adyacentes, por ejemplo proteínas fibrosas, proteínas globulares y complejos de proteína. Los materiales proteínicos adecuados para usarse en la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales (mAb o moAb, del Inglés "monoclonal Antibodies"), anticuerpos monoespecíficos que son idénticos porque se producen mediante un tipo de célula inmune que son todas clones de una única célula parental. Ejemplos no limitantes de anticuerpos monoclonales adecuados incluyen infliximab, basiliximab, abciximab, daclizumab,

5 gentuzumab, alemtuzumab, rituximab, palivizumab, trastuzumab y etanercept. Otros materiales proteínicos adecuados incluyen el Factor Estimulador de Colonia de Granulocito (por ejemplo, Neupogen™), eritropoyetinas (por ejemplo, Recormon™ y Eprex™), interferones (por ejemplo, Avonex™ y Rebif™) y aquellos para terapias de artritis reumatoide (por ejemplo, Enbrel™, Humira™ y Orencia™). El material proteínico está marcado o se ha unido al mismo un resto fluorescente capaz de emitir fluorescencia tras exposición a luz ultravioleta o infrarrojo, tal como se discute más adelante en detalle.

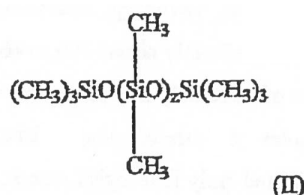
10 En algunas realizaciones no limitantes, el material proteínico está presente en la disolución en una concentración de 20 a 600 µg/ml, o 100 a 300 µg/ml basada en el volumen total de la disolución acuosa.

15 El organopolisiloxano puede ser cualquier organopolisiloxano o aceite de silicona, por ejemplo tal como el que se puede usar para revestir superficies de artículos médicos tales como los tambores de jeringuilla. En algunas de las realizaciones no limitantes, el organopolisiloxano tiene una viscosidad que oscila entre 10⁻⁴ y 1 m²/s (100 y 1.000.000 centistokes (cSt)), anterior a cualquier etapa de curado, o 10⁻³ y 0,1 m²/s (1.000 cSt y 100.000 cSt), o 10⁻³ y 15x10⁻³ m²/s (1.000 cSt y 15.000 cSt), o 12,5x10⁻³ m²/s (12.500 cSt).

En algunas realizaciones no limitantes, el organopolisiloxano comprende un organopolisiloxano alquilo sustituido, por ejemplo como se representa por la siguiente Fórmula estructural (I):



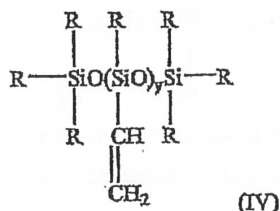
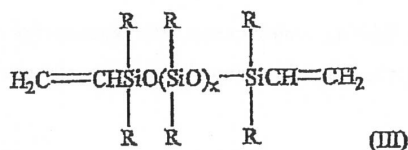
20 en la que "R" es alquilo y "Z" es 30 a 4.500. En algunas realizaciones no limitantes, el organopolisiloxano de Fórmula (I) puede estar representado por la siguiente Fórmula estructural (II):



25 en la que "Z" puede ser como la anterior, o por ejemplo puede ser 300 a 2.000, 300 a 1.800, o 300 a 1.350. En algunas realizaciones no limitantes, el organopolisiloxano es un polidimetilsiloxano, tal como polidimetilsiloxano DOW CORNING® 360 o polidimetilsiloxano NUSIL que tiene una viscosidad que oscila entre 10⁻⁴ y 1 m²/s (100 y 1.000.000 cSt).

30 En algunas realizaciones no limitantes, el organopolisiloxano comprende uno o más grupos funcionales curables o reactivos, tales como grupos alquenoilo. Cada grupo alquenoilo se puede seleccionar independientemente entre el grupo que consiste en vinilo, alilo, propenilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, heptenilo, octenilo, nonenilo y decenilo. Un experto en la técnica entenderá que el organopolisiloxano puede comprender uno o más de cualquiera de los anteriores tipos de grupos alquenoilo y sus mezclas. En algunas realizaciones, al menos un grupo alquenoilo es vinilo. A mayor contenido de alquenoilo o vinilo se proporciona reticulación más eficiente.

40 En algunas realizaciones no limitantes, el organopolisiloxano puede estar representado por las siguientes Fórmulas estructurales (III) ó (IV):



en las que "R" es alquilo, haloalquilo, arilo, haloarilo, cicloalquilo, silaciclopentilo, aralquilo y sus mezclas, "X" es 60 a 1.000, preferiblemente 200 a 320; e "y" es 3 a 25. Los copolímeros y mezclas de estos polímeros también están contemplados.

Ejemplos no limitantes de organopolisiloxanos funcionales de vinilo útiles incluyen: polidimetilsiloxanos terminados en vinildimetilsiloxi; vinilmetilo terminado en trimetilsiloxi, copolímeros de dimetilpolisiloxano; vinilmetilo terminados en vinildimetilsiloxi, copolímeros de dimetilpolisiloxano; polidimetilsiloxanos terminados en divinilmetilsiloxi; polidimetilsiloxanos terminados en vinilo, n-butilmetilo; y polidimetilsiloxanos terminados en vinilfenilmetilsiloxi.

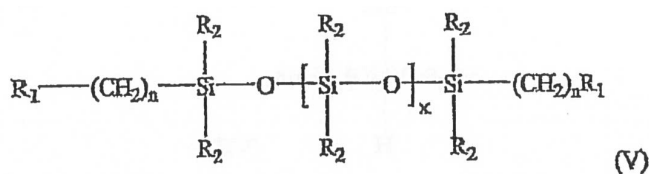
En algunas realizaciones, se puede usar una mezcla de polímeros de siloxano seleccionados entre aquellos de Fórmulas II, III y/o IV. Por ejemplo, la mezcla puede comprender dos polímeros de polidimetilsiloxano terminado en vinildimetilsiloxi de diferente peso molecular, en la que uno de los polímeros tiene un peso molecular medio de 1.000 a 25.000 y preferiblemente 16.000, y el otro polímero tiene un peso molecular medio de 30.000 a 71.000 y preferiblemente 38.000. Generalmente, el siloxano de peso molecular inferior puede estar presente en cantidades de 20% a 80%, tal como 60% en peso de esta mezcla; y el siloxano de mayor peso molecular puede estar presente en cantidades de 80% a 20%, tal como 40% en peso de esta mezcla.

Otro ejemplo no limitante de un organopolisiloxano funcional de vinilo adecuado es copolímero de (vinilmetilsiloxano al 7,0-8,0%)-dimetilsiloxano, terminado en trimetilsiloxi, tal como copolímero de vinilmetilsiloxano VDT-731 que está comercialmente disponible por Gelest, Inc. of Morrisville, PA.

En algunas realizaciones no limitantes, el organopolisiloxano puede comprender al menos dos grupos polares. Cada grupo polar se puede seleccionar independientemente entre el grupo que consiste en acrilato, metacrilato, amino, imino, hidroxilo, epoxi, éster, alquiloxi, isocianato, fenólico, poliuretano oligomérico, poliamida oligomérica, poliéster oligomérico, poliéter oligomérico, poliol y grupos carboxipropilo. Un experto en la técnica entenderá que el organopolisiloxano puede comprender uno o más de cualquiera de los anteriores grupos polares y sus mezclas. En algunas realizaciones no limitantes, los grupos polares son grupos acrilatos, por ejemplo, grupos acriloxipropilo. En otras realizaciones, los grupos polares son grupos metacrilato, tales como los grupos metacriloxipropilo. El organopolisiloxano que tiene grupos polares comprende además uno o más grupos alquilo y/o grupos arilo, tales como grupos metilo, grupos etilo o grupos fenilo.

Ejemplos no limitantes de tales organopolisiloxanos incluyen copolímero [(acriloxipropil)metilsiloxano al 15-20%]-dimetilsiloxano, tal como siloxano funcional de acrilato UMS-182, el cual está disponible por Gelest, Inc. of Morrisville, PA y polímero de silicona acrilatada SILCOLEASE® PC970, el cual está disponible por Rhodia-Silicones.

En algunas realizaciones no limitantes, tal organopolisiloxano puede estar representado por la Fórmula (V):



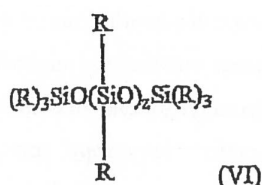
en la que "R₁" se selecciona entre el grupo que consiste en acrilato, metacrilato, amino, imino, hidroxilo, epoxi, éster, alquiloxi, isocianato, fenólico, poliuretano oligomérico, poliamida oligomérica, poliéster oligomérico, poliéter

oligomérico, polioli, carboxipropilo y grupos fluoro; y "R₂" es alquilo, "n" oscila entre 2 y 4 y "x" es un número entero suficiente para dar al lubricante una viscosidad de 10⁻⁴ a 1 m²/s (100 a 1.000.000 cSt).

5 En algunas realizaciones no limitantes, el organopolisiloxano puede comprender además uno o más grupos fluoro, tales como grupos -F o fluoroalquilo tales como grupos trifluorometilo. Otros organopolisiloxanos útiles incluyen polifluoroalquilmetil siloxanos y copolímeros fluoroalquil, dimetil siloxano.

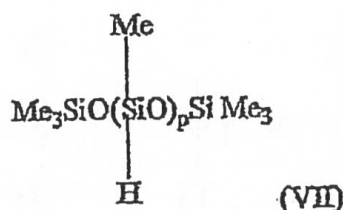
10 En algunas realizaciones no limitantes, la composición puede comprender además uno o más siloxano(s) cíclico(s), por ejemplo, octametilciclotetrasiloxano y/o decametilciclopentasiloxano.

10 En algunas realizaciones no limitantes, el organopolisiloxano puede estar representado por la siguiente Fórmula estructural (VI):

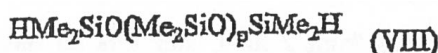


15 en la que "R" es haloalquilo, arilo (tal como fenilo), haloarilo, cicloalquilo, silaciclopentilo, aralquilo y sus mezclas; y "Z" es 20 a 1.800.

20 En algunas realizaciones no limitantes, el organopolisiloxano comprende al menos dos grupos hidrógeno colgantes. Ejemplos no limitantes de organopolisiloxanos adecuados que comprenden al menos dos grupos hidrógeno colgantes incluyen organopolisiloxanos que tienen grupos hidrógeno colgantes a lo largo de la cadena principal del polímero o grupos hidrógeno terminales. En algunas realizaciones no-limitantes, el organopolisiloxano puede estar representado por la siguiente Fórmula estructural (VII):

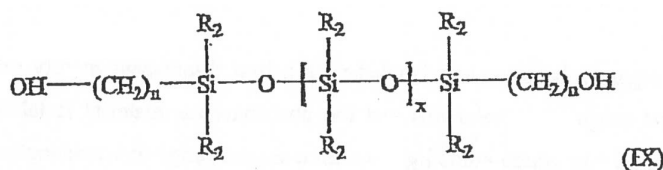


25 en la que "p" es 8 a 125, por ejemplo, aproximadamente 30. En otras realizaciones no limitantes, el organopolisiloxano puede estar representado por la siguiente Fórmula estructural (VIII):



30 en la que "p" es 140 a 170, por ejemplo, 150 a 160. Se puede usar una mezcla de estos polímeros comprendiendo dos materiales de diferente peso molecular. Por ejemplo, 2% a 5% en peso de la mezcla de un polimetilhidrosiloxano terminado en trimetilsiloxi que tiene un peso molecular medio de 400 a 7.500, por ejemplo 1.900, se puede usar en
35 mezcla con 98% a 95% de un polidimetilsiloxano terminado en dimetilhidrosiloxi que tiene un peso molecular medio de 400 a 37.000 y preferiblemente 12.000. Ejemplos no limitantes de organopolisiloxanos útiles que comprenden al menos dos grupos hidrógeno colgantes incluyen polidimetilsiloxanos terminados en dimetilhidro; copolímeros de metilhidro, dimetilpolisiloxano; copolímeros de metiloctil dimetilpolisiloxano terminado en dimetilhidrosiloxi; y copolímeros de metilhidro, fenilmetil siloxano.

40 En algunas realizaciones no limitantes, la composición comprende siloxanos hidroxil funcional, por ejemplo un siloxano hidroxil funcional que comprende al menos dos grupos hidroxilo, tal como por ejemplo:



- 5 en el que "R₂" es alquilo, "n" oscila entre 0 y 4, y "x" es un número entero suficiente para dar al lubricante una viscosidad de 10⁻⁴ a 1 m²/s (100 a 1.000.00 cSt). En algunas realizaciones no limitantes, los siloxanos curables por humedad que tienen carácter de curado por humedad como resultado de la funcionalidad incluyen siloxanos que tienen grupos funcionales tales como: alcoxi; ariloxi; oxima; epoxi; -OOCR; N,N-dialquilamino; N,N-dialquilaminoxí; N-alquilamido; -O-NH-C(O)-R; -O-C(=NCH₃)-NH-CH₃; y -O-C(CH₃)=CH₂, en los que "R" es H o hidrocarbilo. Tal como se usa en la presente memoria, "curable por humedad" quiere decir que el siloxano es curable a condiciones ambiente en presencia de humedad atmosférica.
- 10 En la presente invención se pueden usar mezclas de cualquiera de los organopolisiloxanos anteriormente discutidos.
- En algunas realizaciones no limitantes, el organopolisiloxano comprende aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1 por ciento en peso de la disolución.
- 15 El material proteínico y el organopolisiloxano están cada uno marcados con un resto fluorescente que emite fluorescencia a una diferente longitud de onda de luz que no se superponen sustancialmente. También, si está presente más de un tipo de material proteínico y/o más de un tipo de organopolisiloxano, cada tipo diferente de material proteínico y/o cada tipo diferente de organopolisiloxano puede estar marcado con un resto fluorescente que emite fluorescencia a una diferente longitud de onda de luz que no se superpone sustancialmente.
- 20 Tal como se usa en la presente memoria, un "tipo diferente" de material proteínico quiere decir un material proteínico químicamente diferente, por ejemplo el primer material proteínico tiene al menos un átomo diferente o diferente configuración de átomos del segundo tipo de material proteínico. De manera similar, tal como se usa en la presente memoria, un "tipo diferente" de organopolisiloxano quiere decir un organopolisiloxano químicamente diferente, por ejemplo el primer organopolisiloxano tiene al menos un átomo diferente o diferente configuración de átomos del
- 25 segundo tipo de organopolisiloxano.
- Los respectivos restos fluorescentes usados para marcar el(los) material(es) proteínico(s) y organopolisiloxano(s) se seleccionan por características de excitación y/o emisión para minimizar las contribuciones del ruido de fondo óptico que pueden resultar de la emisión espectral de un resto fluorescente que aparece en el detector usado para medir el
- 30 otro resto fluorescente.
- El organopolisiloxano está marcado con un primer resto fluorescente que emite luz dentro de un primer intervalo de longitudes de onda y el material proteínico está marcado con un segundo resto fluorescente que emite luz dentro de un segundo intervalo de longitudes de onda cuando el primer resto fluorescente y el segundo resto fluorescente se exponen cada uno a luz de la misma longitud de onda emitida por un laser, donde el primer intervalo de longitudes de onda está sustancialmente libre de superposición con el segundo intervalo de longitudes de onda.
- 35 Tal como se usa en la presente memoria, "sustancialmente no superpuesto" quiere decir que los respectivos fluorocromos son seleccionados de modo que sus espectros de emisión tengan mínima o no significativa superposición cuando se excitan mediante el mismo laser. En algunas realizaciones no limitantes, "sustancialmente no superpuesto" puede querer decir que el primer intervalo de longitudes de onda se superpone con el segundo intervalo de longitudes de onda menos del 5% en base al intervalo normalizado combinado total de longitudes de onda del primer intervalo de longitudes de onda y el segundo intervalo de longitudes de onda, o menos del 2%, o menos del 1%. Por ejemplo, el organopolisiloxano puede estar marcado con resto fluorescente de Rojo Nilo que emite niveles indetectables de luz a lo largo de un intervalo de 450 nm a 650 nm y el material proteínico puede estar marcado con tinte Pacific Blue que emite luz a lo largo de un intervalo de 340 nm a 450 nm cuando se expone a un laser violeta de 405 nm.
- 40 Este planteamiento maximiza la sensibilidad de detección para pequeñas cantidades de un primer material fluorescentemente marcado al minimizar las contribuciones del ruido de fondo óptico a partir de otros materiales marcados con diferentes restos fluorescentes. Por ejemplo, se puede aumentar la sensibilidad de detección para pequeñas cantidades de proteína marcada al minimizar las contribuciones del ruido de fondo óptico a partir de organopolisiloxano fluorescentemente marcado. Esto puede ser deseable para la sensibilidad de detección si hay alguna proteína marcada libre no asociada a una gotita de aceite permaneciendo en el tampón circundante.
- 45 Ahora se discutirá la marcación de el(los) material(es) proteínico(s) y organopolisiloxano(s) en referencia a un único tipo de material proteínico y un único tipo de organopolisiloxano, aunque un experto en la técnica apreciaría que el mismo concepto de usar restos que emiten fluorescencia a longitudes de onda sustancialmente diferentes se puede usar para múltiple(s) material(es) proteínico(s) y múltiple(s) organopolisiloxano(s). En algunas realizaciones no limitantes, el resto fluorescente conjugado con la proteína se puede seleccionar entre los restos que se excitan con un laser violeta (405 nm), azul (488 nm) o rojo (635 nm) siempre que la banda de emisión no se superponga
- 50
- 55
- 60

sustancialmente a la del otro resto fluorescente o tinte seleccionado para marcar el organopolisiloxano, tal como se ha discutido anteriormente.

Por ejemplo, tal como se muestra en la Figura 11, se puede usar Rojo Nilo para marcar el organopolisiloxano y excitar o emitir a lo largo de un amplio intervalo (desde 450 nm a 650 nm con un máximo cerca de 559 nm), o desde 575 nm a 750 nm, y se puede usar con un laser azul o verde. Si se usa Rojo Nilo para marcar aceite, es deseable elegir un marcador para la proteína que se excita y emite en una región diferente del espectro, y para hacer las mediciones usando un sistema de citómetro de flujo con láseres espacialmente separados para ganar sensibilidad óptica. Ejemplos no limitantes de restos fluorescentes adecuados para usarse para marcar el material proteínico cuando el organopolisiloxano está marcado con Rojo Nilo incluyen tinte Pacific Blue™ basado en el 6,8-difluoro-7-hidroxycoumarina fluoróforo (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) que se excita a lo largo de un intervalo específico desde 340 nm a 450 nm con un máximo cerca de 403 nm y se puede usar con un laser violeta; BD Horizon™ V450 (Becton Dickinson) que se excita a lo largo de un intervalo específico (desde 340 nm a 450 nm con un máximo cerca de 403 nm) y se puede usar con un laser violeta; Proteína Cian Fluorescente (CFP, del Inglés "Cyan Fluorescent Protein") que se excita a lo largo de un intervalo específico desde 350 nm a 495 nm con un máximo cerca de 435 nm y se puede usar con un laser violeta; proteína AmCyan de 108 KDa derivada de Anemonia Majano (Becton Dickinson) que se excita a lo largo de un intervalo específico (desde 360 nm a 500 nm con un máximo cerca de 458 nm) y se puede usar con un laser violeta; QDot® 525 (Invitrogen Corporation) que se excita a lo largo de un intervalo específico desde <300 nm a 520 nm y se puede usar con un laser violeta; y QDot® 545 (Invitrogen Corporation) que se excita a lo largo de un intervalo específico desde <300 nm a 540 nm y se puede usar con un laser violeta. Alternativamente, Rojo Nilo se puede usar para marcar el material proteínico y uno de los otros tintes discutidos inmediatamente antes se pueden usar para marcar el organopolisiloxano.

Alternativamente, se puede usar una diversidad de tintes lipófilos, tales como 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH, del Inglés "1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene"), dioctadecil-indocarbocianina (DiI), perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina (DiO), DiIC18(5) (DiD), yoduro de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindotricarbocianina (DiR), o cualquier otro tinte lipófilo para marcar el organopolisiloxano mediante una diversidad de medios bien conocidos por los expertos en la técnica para hacer uso específico de diversos láseres y regiones del espectro de fluorescencia que mínimamente afectarán cualquiera de las mediciones de alta sensibilidad simultáneas requeridas usando otras regiones del espectro para detectar proteína fluorescentemente marcada. Por ejemplo, si se usa DiD para marcar organopolisiloxano (excitación y emisión de laser rojo cerca de 670 nm), todos los intervalos de excitación y emisión por debajo de eso serían útiles para detectar una o más proteínas fluorescentemente marcadas, permitiendo utilizar el uso de fluorocromos excitados por laser UV, violeta, azul o verde sin superposición sustancial en su espectro de emisión para marcar el material proteínico.

En algunas realizaciones, el resto fluorescente se puede seleccionar entre restos que emiten fluorescencia en el intervalo del verde (525-585 nm)(normalmente FL1 marcada), tal como Isotiocianato de Fluoresceína FITC (del Inglés "Fluorescein Isothiocyanate"), Alexa Fluor 488, DyLight 488, Proteína Verde fluorescente GFP (del Inglés "Green Fluorescence Protein"), Diacetato de Carboxifluoresceína Succinimidil Ester CFDA-SE (del Inglés "Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester"), Fosfoinositido PI (del Inglés "Phosphoinositide"); en el intervalo del naranja (normalmente FL2), tal como R-Ficoeritrina PE (del Inglés "Phycoerythrine"); en el intervalo del rojo (normalmente FL3): Proteína Clorofila Piridina PerCP (del Inglés "Peridinin Chlorophyll Protein"), R-Ficoeritrina Cianina 5 PE-Cy5 (del Inglés "R-Phycoerythrin Cyanine 5"), PE-Alexa Fluor 700, R-Ficoeritrina Cianina 5,5 PE-Cy5,5 (del Inglés "R-Phycoerythrin Cyanine 5,5"); en el intervalo del infrarrojo (normalmente FL4): PE-Alexa Fluor 750, PE-Cy7, usando laser de diodo rojo (635 nm).

Para partículas escaneadas, se puede usar fluorescencia de dispersión de luz frontal (FSC, dispersión de luz de ángulo estrecho) y dispersión de luz lateral (SSC, dispersión de luz a 90°) a partir de fluorocromos excitados por laser violeta (405 nm), laser azul (488 nm), laser verde (532 nm), laser amarillo (561 nm) y laser rojo (635 nm). En algunas realizaciones no limitantes, el material proteínico puede estar químicamente marcado con tinte Alexa Fluor® 488 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) de acuerdo con los protocolos bien documentados (MP 00143, "Amine-Reactive Probes", Invitrogen Corporation). En otras realizaciones no limitantes, el material proteínico puede estar químicamente marcado con tinte Pacific Blue™ de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tal como mediante el uso de kits comerciales adecuados disponibles de Invitrogen. Para marcar el organopolisiloxano, se puede disolver tinte Rojo Nilo en organopolisiloxano a 5 mg/ml. El Rojo Nilo, 9-dietilamino-5-benzofenoxazin-5-ona, es un tinte extremadamente hidrófobo cuya fluorescencia se apaga completamente en agua.

El tinte Pacific Blue™ tiene un máximo de excitación a 404 nm y un máximo de emisión de 455 nm, y el tinte Rojo Nilo tiene un máximo de excitación a 559 nm, máximo de emisión de 637 nm. El Rojo Nilo básicamente no se excita a la longitud de onda del laser violeta lo cual minimiza el ruido de fondo óptico del organopolisiloxano en el detector usado para medir las partículas de proteína. A la inversa, cuando las partículas atraviesan el laser azul, el tinte Pacific Blue™ no se excita minimizando el excedente de señal en el detector de Rojo Nilo. Las suspensiones con mAb químicamente marcado y organopolisiloxano tintado se pueden escanear con el analizador de Citómetro de

Flujo BD FACScan™ o un analizador de Citómetro de Flujo BD FACSCanto™ multilaser o Citómetro de Flujo BD™ LSR II (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ).

La Citometría de flujo es un proceso analítico para contar, examinar y clasificar partículas microscópicas suspendidas en una corriente de fluido. Permite el análisis multiparamétrico simultáneo de las características físicas y/o químicas de partículas individuales que fluyen a través de un aparato de detección óptico y/o electrónico. En el citómetro de flujo, se enfocan uno o más haces de luz monocromática (normalmente luz de laser) sobre una corriente hidrodinámicamente enfocada de fluido que contiene la muestra. Se alinean una pluralidad de detectores al punto donde la corriente pasa a través del haz de luz; uno en línea con el haz de luz principal (Dispersión Frontral o FSC, del Inglés "Forward Scatter") y varios perpendiculares al mismo (Dispersión Lateral o SSC, del Inglés "Side Scatter") y uno o más detectores fluorescentes. Cada partícula suspendida que pasa a través del haz ligeramente enfocado dispersa la luz en una diversidad de direcciones de acuerdo con la teoría de Mie, y las etiquetas fluorescentes unidas a la partícula se pueden excitar dentro de la luz emisora a una frecuencia inferior que la fuente de luz. Esta combinación de luz dispersada y fluorescente es detectada por los detectores. Al analizar fluctuaciones en la luminosidad en cada detector (una para cada pico de emisión fluorescente) es posible derivar diversos tipos de información sobre la estructura física y química de cada partícula individual. FSC generalmente se correlaciona bien con el tamaño de partícula y características refractivas y SSC depende del tamaño y la complejidad interna de la partícula (es decir, forma de un núcleo celular, la cantidad y el tipo de partícula o la rugosidad de partícula). Algunos citómetros de flujo forman imágenes de cada fluorescencia de partícula, luz dispersada y luz transmitida.

Los citómetros de flujo son capaces de analizar varios miles de partículas cada segundo, y los clasificadores de célula FACS multilaser tal como el BD FACSAria™ II y las plataformas clasificadoras de flujo BD™ pueden separar activamente y aislar partículas que tienen propiedades especificadas. Un citómetro de flujo incluye una corriente de flujo célula-líquido (disolución) que lleva y alinea las células de manera que pasan en fila india a través del haz de luz para detectar; una o más fuentes de luz, tales como una lámpara de mercurio o xenón, láseres apagados por agua de alto poder (argón, criptón, laser de tinte), láseres apagados por aire de bajo poder (argón (488 nm), rojo-HeNe (633 nm), verde-HeNe, HeCd (UV)), o láseres de diodo (azul, verde, rojo, violeta); detectores múltiples que generan FSC y SSC así como señales de fluorescencia, un sistema de conversión análogo a digital (ADC, del Inglés "Analog to Digital Conversion"), un sistema de amplificación lineal o logarítmica y un ordenador para el análisis de las señales. Los datos generados por los citómetros de flujo se pueden trazar como un histograma de parámetro sencillo, como diagrama de puntos bidimensionales (diagramas de gramos de dispersión, densidad o contorno) o incluso como manifestaciones isométricas tridimensionales. Las regiones gráficas de interés se pueden dibujar para definir poblaciones de interés, y normalmente se combinan mediante la Booleana insinuada y lógica en forma de un árbol de "gate" jerárquico ("hierarchal gate tree"), en el cual el término "gate" (ventana de análisis) se refiere a una o más regiones combinadas de interés dentro de las cuales se encuentran las partículas de interés. Los diagramas con frecuencia se hacen sobre escalas logarítmicas siempre que los datos tienen un gran intervalo dinámico, hasta 4 ó 5 décadas. Puesto que los espectros de emisión de diferentes tintes fluorescentes se superponen, las señales de los detectores se pueden compensar electrónicamente así como informáticamente. Sin embargo, mientras que este proceso realinea las medianas de población, los efectos de las estadísticas del fotón a partir de la medición original permanecen, dando como resultado "la propagación" entre las poblaciones significativamente realineadas (es decir, donde las contribuciones del ruido de fondo de otras señales fluorescentes son significativas). Generalmente, los datos adquiridos usando el citómetro de flujo se vuelven a analizar después de la adquisición con el programa informático tal como el programa BD FACSDiva.

La clasificación celular o la clasificación de partícula activada por fluorescencia es un tipo especializado de citometría de flujo. Proporciona un método para la clasificación de una mezcla heterogénea de partículas dentro de dos o más recipientes, de una célula en una, basado en la dispersión específica de luz y en las características fluorescentes de cada célula. Registra señales fluorescentes a partir de células individuales, y separa físicamente células de interés particular. El acrónimo FACS está comercialmente registrado y pertenece a Becton Dickinson.

La suspensión de partícula se incorpora en el centro de una corriente estrecha de líquido que fluye rápidamente. El flujo se dispone de manera que como promedio (distribución de Poisson) haya una gran separación entre partículas relativa a su diámetro. Un mecanismo vibratorio causa que la corriente de partículas se rompa en gotitas individuales. El sistema se ajusta de manera que haya una baja probabilidad de estar más de una partícula en una gotita. Justo antes de que la corriente se rompa en gotitas el flujo pasa a través de uno o más cruces de láser donde se mide el carácter fluorescente de interés de cada una de las partículas. Si una partícula es para ser recogida, se aplica una carga a la célula del flujo durante el periodo de tiempo de formar una o más gotas y salir de la corriente. A continuación, estas gotitas cargadas caen a través de un sistema de desvío electrostático que desvía gotitas en recipientes objetivos en base a la carga aplicada a la gotita.

Al usar un aparato tal como un dispositivo de escaneo de partícula activada por fluorescencia o citómetro de flujo FACS™, se puede determinar la intensidad de fluorescencia de partícula relativa del organopolisiloxano fluorescentemente marcado y el material proteínico fluorescentemente marcado usando la clasificación de partícula

activada por fluorescencia. Se puede comparar la intensidad relativa del organopolisiloxano fluorescentemente marcado con la intensidad relativa del material proteínico fluorescentemente marcado y se puede determinar la cantidad de material proteínico agregado o aglomerado con el organopolisiloxano. La "Agregación" del material proteínico con el organopolisiloxano incluye adsorción del material proteínico a organopolisiloxano así como agregación del material proteínico nucleado por organopolisiloxano, e incluye cualquier asociación irreversible entre organopolisiloxano y el material proteínico.

Cada disolución se puede analizar mediante escaneo de partícula activada por fluorescencia para determinar la composición de partícula. El escaneo de partícula activada por fluorescencia se puede usar para analizar el tamaño de partícula, morfología y fluorescencia relativa de partícula. Otros análisis útiles incluyen la determinación de la turbiedad de suspensión, la concentración en número de gotita de aceite de silicona y la distribución por tamaño de gotita de aceite de silicona. Las densidades ópticas se pueden determinar usando un espectrofotómetro Lambda 35 PerkinElmer (Wellesley, MA). Después de una agitación breve y suave para someter a desfloculación los aglomerados de gotita, se pueden medir las densidades ópticas de la suspensión de aceite de silicona a 660 nm en función del tiempo y la condición de formulación. En filtrado acuoso, se puede medir la absorbancia del material proteínico a 280 nm para determinar las concentraciones de mAb. Alternativamente, se pueden medir las concentraciones de material proteínico con un ensayo de unión a tinte Coomassie (Coomassie Plus™ Better Bradford Assay Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

Se pueden medir las distribuciones de tamaño de gotita de aceite de silicona usando un analizador de tamaño de partícula por difracción de láser Coulter LS230 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Las distribuciones de tamaño relativo se pueden medir para suspensiones inmediatamente después de la homogeneización y en función del tiempo hasta 2 semanas después de la preparación de la suspensión. A partir de las distribuciones de tamaño relativo y las concentraciones en número de gotita de aceite de silicona, se puede estimar el área superficial del aceite de silicona total.

La intensidad de fluorescencia de partícula relativa del organopolisiloxano fluorescentemente marcado y el material proteínico fluorescentemente marcado se determina usando FRET (del Inglés "Fluorescence Resonance Energy Transfer" o "Förster Resonance Energy Transfer", transferencia de energía de resonancia de fluorescencia o transferencia de energía de resonancia Förster) en que el resto de fluorescencia donante se une al aceite y el resto de fluorescencia aceptor se une a la proteína. Al usar la tecnología FRET, la emisión a partir del aceptor no ocurrirá al menos que esté en contacto extremadamente cercano con la superficie del aceite, lo cual puede posibilitar mediciones más precisas. Un cromóforo donante en su estado excitado puede transferir energía mediante un mecanismo de acoplamiento dipolo-dipolo a gran intervalo, no radiactivo a un cromóforo aceptor en proximidad cercana (generalmente <10 nm). Para hacer un seguimiento de la formación del complejo entre dos moléculas, una de ellas se marca con un donante y la otra con un aceptor, y estas moléculas marcadas con fluoróforo se mezclan. Cuando las moléculas se disocian, la emisión donante se detecta tras la excitación del donante. Por otro lado, cuando el donante y el aceptor están en proximidad (1-10 nm) debido a la interacción de las dos moléculas, la emisión del aceptor se observa predominantemente debido a la FRET intermolecular del donante al aceptor.

En algunas realizaciones no limitantes, la suspensión acuosa comprende además al menos un tensioactivo no iónico. El tensioactivo no iónico puede reducir los índices de coalescencia del aceite de silicona. Por tanto, las gotitas de aceite suspendido permanecen en disolución más tiempo cuando está presente el tensioactivo no iónico.

Ejemplos no limitantes de tensioactivos no iónicos adecuados incluyen glicoles acetilénicos, alcanolamidas, alcanolaminas, alquil fenoles, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, glicerol ésteres, monododecil éteres, derivados del fenol, poloxámeros, poloxaminas, polioxietileno acil éteres, polioxietilenglicol dodecil éteres, dodecil sulfatos de sodio, sorbitoles, derivados del sorbitán y sus mezclas. En algunas realizaciones no limitantes, el tensioactivo no iónico es un derivado del sorbitán seleccionado entre el grupo que consiste en ésteres de ácido graso de sorbitán, ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitán y sus mezclas. En algunas realizaciones no limitantes, el tensioactivo no iónico es un éster de ácido graso de polioxietileno sorbitán, tal como monolaurato de polioxietileno 20 sorbitán Tween 20®, también conocido como Polisorbato 20. Otros ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitán útiles incluyen Polisorbato 21, Polisorbato 40, Polisorbato 60, Polisorbato 61, Polisorbato 65, Polisorbato 80, Polisorbato 81, Polisorbato 85 ó Polisorbato 120.

La cantidad de tensioactivo no iónico en la disolución puede oscilar entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 0,5 porcentaje en peso en base al peso total de la disolución acuosa.

La suspensión acuosa comprende además al menos un azúcar. El azúcar puede aumentar el índice de coalescencia del organopolisiloxano, de modo que esté disponible menos área superficial del organopolisiloxano para atraer el material proteínico. Los azúcares adecuados incluyen monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y sus mezclas. Ejemplos no limitantes de azúcares adecuados incluyen sacarosa, lactosa, fructosa, glucosa, galactosa, manosa, trehalosa y sus mezclas.

La cantidad de azúcar en la disolución puede oscilar entre 0,005 y 10 porcentaje en peso en base al peso total de la disolución acuosa.

5 La presencia combinada de azúcar y tensioactivo no iónico además puede reducir la agregación del material proteínico. En algunas realizaciones no limitantes, la disolución puede comprender al menos un azúcar y al menos un tensioactivo no iónico, tal como éster de ácido graso de polioxietilen sorbitán y sacarosa, en cantidades o concentraciones tales como las anteriormente descritas.

10 En algunas realizaciones no limitantes, el método comprende además proporcionar una pluralidad de suspensiones acuosas de un organopolisiloxano fluorescentemente marcado y un material proteínico fluorescentemente marcado, en el que cada suspensión acuosa comprende además al menos un inhibidor de agregación seleccionado entre el grupo que consiste en tensioactivos no iónicos y azúcares en el que una concentración del al menos un inhibidor de agregación es diferente en cada suspensión acuosa, medir la intensidad de fluorescencia de partícula relativa del organopolisiloxano fluorescentemente marcado y del material proteínico fluorescentemente marcado en cada suspensión acuosa usando la clasificación de partícula activada por fluorescencia; y comparar la intensidad relativa del organopolisiloxano fluorescentemente marcado con la intensidad relativa del material proteínico fluorescentemente marcado para cada suspensión acuosa.

20 En algunas realizaciones no limitantes, el método comprende además proporcionar una pluralidad de suspensiones acuosas de un organopolisiloxano fluorescentemente marcado y un material proteínico fluorescentemente marcado, en el que cada suspensión acuosa comprende además al menos un inhibidor de agregación seleccionado entre el grupo que consiste en tensioactivos no iónicos y azúcares en el que el al menos un inhibidor de agregación es diferente en cada suspensión acuosa, medir la intensidad de fluorescencia de partícula relativa del organopolisiloxano fluorescentemente marcado y el material proteínico fluorescentemente marcado en cada suspensión acuosa usando la clasificación de partícula activada por fluorescencia; y comparar la intensidad relativa del organopolisiloxano fluorescentemente marcado con la intensidad relativa del material proteínico fluorescentemente marcado para cada suspensión acuosa. El inhibidor de agregación en cada disolución es químicamente diferente o de un tipo diferente, por ejemplo azúcares diferentes y/o tensioactivos no iónicos diferentes.

En referencia a la Figura 10, se muestra un diagrama de flujo para un método para preparar y analizar muestras de disoluciones de organopolisiloxano de acuerdo con la presente invención. Las disoluciones se pueden preparar y analizar tal como se ha discutido anteriormente y en detalle a continuación en el Ejemplo A.

35 En algunas realizaciones no limitantes, el método comprende además seleccionar al menos un inhibidor de agregación para usarse en una suspensión que comprende un material proteínico basado en la comparación de la intensidad relativa del organopolisiloxano fluorescentemente marcado con la intensidad relativa del material proteínico fluorescentemente marcado para cada suspensión acuosa.

40 En algunas realizaciones no limitantes, la presente invención proporciona un método para inhibir la agregación de un material proteínico en una suspensión que comprende un organopolisiloxano, que comprende: (a) proporcionar una pluralidad de suspensiones acuosas de un organopolisiloxano fluorescentemente marcado y un material proteínico fluorescentemente marcado, en el que cada suspensión acuosa comprende además al menos un inhibidor de agregación seleccionado entre el grupo que consiste en tensioactivos no iónicos y azúcares en el que (i) el al menos un inhibidor de agregación es diferente en cada suspensión acuosa, o (ii) la cantidad de inhibidor de agregación es diferente en cada disolución acuosa; (b) medir la intensidad de fluorescencia de partícula relativa del organopolisiloxano fluorescentemente marcado y el material proteínico fluorescentemente marcado en cada suspensión acuosa usando la clasificación de partícula activada por fluorescencia; (c) comparar la intensidad relativa del organopolisiloxano fluorescentemente marcado para cada suspensión acuosa; y (d) seleccionar al menos un inhibidor de agregación para usarse en una suspensión que comprende un material proteínico basado en la comparación de la intensidad relativa del organopolisiloxano fluorescentemente marcado con la intensidad relativa del material proteínico fluorescentemente marcado para cada suspensión acuosa.

55 Mediante uno o más de los anteriores métodos, se puede determinar una combinación adecuada de azúcar y tensioactivo no iónico (y sus concentraciones adecuadas) para usarse en artículos médicos que usan un revestimiento de organopolisiloxano sobre superficies en contacto con una disolución que comprende material proteínico.

60 En algunas realizaciones no limitantes, la presente invención proporciona un artículo médico, que comprende: (a) un recipiente que comprende una cámara para recibir una disolución, en el que la superficie interna de la cámara tiene un revestimiento sobre la misma preparado a partir de una composición que comprende un organopolisiloxano; y (b)

una disolución que comprende: (i) al menos un material proteínico; (ii) al menos un tensioactivo no iónico; y (iii) al menos un azúcar.

5 Tal como se usa en la presente memoria, "artículo médico" quiere decir un artículo o dispositivo que puede ser útil para el tratamiento médico. Ejemplos no limitantes de artículos médicos incluyen montajes de jeringuillas, cartuchos de fármaco, inyectores sin agujas, dispositivos dispensadores de líquido y dispositivos medidores de líquido. En algunas realizaciones, el artículo médico es un montaje de jeringuilla que comprende una cámara o tambor de jeringuilla (para recibir la disolución que comprende material proteínico, por ejemplo) y un miembro sellador.

10 La cámara puede estar formada de vidrio, metal, cerámica, plástico, caucho o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones no limitantes, la cámara está preparada a partir de uno o más polímeros olefínicos, tales como polietileno, polipropileno, poli(1-buteno), poli(2-metil-1-penteno) y/o poliolefina cíclica. Por ejemplo, la poliolefina puede ser un homopolímero o un copolímero de una monoolefina alifática, teniendo la monoolefina alifática preferiblemente aproximadamente 2 a 6 átomos de carbono, tal como el polipropileno. En algunas realizaciones no limitantes, la poliolefina puede ser básicamente lineal, pero opcionalmente puede contener cadenas laterales tal como se encuentran, por ejemplo, en polietileno convencional de baja densidad. En algunas realizaciones no limitantes, la poliolefina es al menos 50% isotáctica. En otras realizaciones, la poliolefina es al menos aproximadamente 90% isotáctica en estructura. En algunas realizaciones no limitantes, se pueden usar polímeros sindiotácticos. En algunas realizaciones, se pueden usar poliolefinas cíclicas. Ejemplos no limitantes de poliolefinas cíclicas adecuadas incluyen polímeros de norborneno tales como los descritos en los documentos de Patentes U.S. N° 6.525.144, 6.511.756, 5.599.882 y 5.034.482 (cada una de Zeon Corp.), 7.037.993, 6.995.226, 6.908.970, 6.653.424 y 6.486.264 (cada una de Zeon Corp.), 7.026.401 y 6.951.898 (Ticona), 6.063.886 (Mitsui Chemicals), 5.866.662, 5.856.414, 5.623.039 y 5.610.253 (Hoechst), 5.854.349 y 5.650.471 (Mitsui Petrochemical y Hoechst) y tal como los descritos en "Polycyclic olefins", *process Economics Program* (Julio 1998) SRI Consulting. Ejemplos no limitantes de poliolefinas cíclicas adecuadas incluyen poliolefinas cíclicas Apel™ disponibles por Mitsui Petrochemical, poliolefinas cíclicas Topas™ disponibles por Ticona Engineering Polymers, poliolefinas cíclicas Zeonor™ o Zeonex™ disponibles por Zeon Corporation y poliolefinas cíclicas disponibles por Promerus LLC.

30 La poliolefina puede contener una pequeña cantidad, generalmente de aproximadamente 0,1 a 10 por ciento, de un polímero adicional incorporado en la composición mediante copolimerización con el monómero apropiado. Tales copolímeros se pueden añadir a la composición para aumentar otras características de la composición final, y pueden ser, por ejemplo, poliacrilato, poliestireno y similares.

35 En algunas realizaciones no limitantes, la cámara puede estar construida de una composición de poliolefina que incluye un aditivo estabilizador de radiación para impartir estabilidad de radiación al recipiente, tal como un aditivo de movilización que contribuye a la estabilidad de la radiación del recipiente, tal como por ejemplo aquellos descritos en el documento de Patente U.S. N° 4.959.402 y 4.994.511, asignadas a Becton, Dickinson and Company.

40 El otro componente del artículo médico en contacto con la cámara es el miembro sellador. El miembro sellador puede estar formado de cualquier material elastomérico o plástico. Los elastómeros se usan en muchas aplicaciones importantes y críticas en dispositivos médicos y empaquetado farmacéutico. Como clase de materiales, sus características únicas, tales como flexibilidad, resiliencia, extensibilidad y capacidad de sellado, han probado particularmente adecuarse bien a productos tales como catéteres, puntas de jeringuilla, artículos de vial de fármaco, tubos, guantes y calzas. Generalmente se usan tres elastómeros principales termofijados sintéticos en aplicaciones médicas: caucho de poliisopreno, caucho de silicona y caucho de butilo. De los tres cauchos, el caucho de butilo ha sido la elección más común para artículos debido a su alta pureza y resistencia a permeación lo cual permite al caucho proteger los fármacos sensibles a oxígeno y agua.

50 Los cauchos de butilo adecuados útiles en el método de la presente invención incluyen copolímeros de isobutileno (aproximadamente 97-98%) e isopreno (aproximadamente 2-3%). El caucho de butilo puede estar halogenado con cloro o bromo. Los vulcanizados de caucho de butilo adecuados pueden proporcionar buena resistencia a la abrasión, excelente impermeabilidad a gases, una alta constante dieléctrica, excelente resistencia a envejecimiento y luz solar, y cualidades superiores de absorción de golpe y amortiguación de vibración a artículos formados de los mismos. Ejemplos no limitantes de tapones de caucho adecuados incluyen aquellos disponibles por West Pharmaceuticals, American Gasket Rubber, Stelmi, y Helvoet Rubber & Plastic Technologies BV.

60 Otros copolímeros elastoméricos útiles incluyen, sin limitación, elastómeros termoplásticos, vulcanizados termoplásticos, copolímeros de estireno tales como copolímeros de estireno-butadieno (SBR o SBS), polímeros en bloque de estireno-isopreno (SIS) o estireno-isopreno/butadieno (SIBS), en los cuales el contenido de estireno en el copolímero en bloque de estireno oscila entre aproximadamente 10% y aproximadamente 70%, y preferiblemente entre aproximadamente 20% y aproximadamente 50%. Ejemplos no limitantes de tapones de estireno-butadieno adecuados están disponibles por Firestone Polymers, Dow, Reichhold, Kokoku Rubber Inc., y Chemix Ltd. Otros elastómeros termoplásticos adecuados están disponibles por GLS, Tecknor Apex, AES, Mitsubishi y Solvay

Engineered Polymers, por ejemplo. La composición de elastómero puede incluir, sin limitación, antioxidantes y/o agentes de refuerzo inorgánicos para preservar la estabilidad de la composición del elastómero.

5 En algunas realizaciones, el miembro sellador puede ser por ejemplo un tapón, anillo-O, la punta del émbolo, o pistón. Las puntas del émbolo de la jeringuilla o los pistones generalmente están hechos de un material compresible, resiliente tal como caucho, debido a la capacidad del caucho para proporcionar un sello entre el émbolo y el
10 armazón interior de la jeringuilla. Los émbolos de la jeringuilla, como otro equipo usado en el cuidado y tratamiento de pacientes, tienen que encontrar patrones de alto funcionamiento, tal como la capacidad para proporcionar un sello ajustado entre el émbolo y el tambor de la jeringuilla.

15 El revestimiento de organopolisiloxano está aplicado a al menos una porción de la(s) superficie(s) deslizante(s) de la cámara y/o al miembro sellador. En algunas realizaciones, la cámara está revestida con el revestimiento descrito a continuación y el miembro sellador está no revestido o revestido con un revestimiento de polidimetilsiloxano. En otras realizaciones, el miembro sellador está revestido con el revestimiento descrito a continuación y la cámara está
20 no revestida o revestida con un revestimiento de polidimetilsiloxano. En otras realizaciones, tanto la cámara como el miembro sellador están revestidos con revestimientos como los descritos a continuación.

25 La cámara y/o el miembro sellador están revestidos con un revestimiento preparado a partir de una composición que comprende uno o más organopolisiloxano(s). La aplicación de un revestimiento a la superficie interna de la cámara o superficie externa del miembro sellador se puede conseguir mediante cualquier método adecuado, como, por ejemplo, baño, cepillado, rociado y similar. La composición se puede aplicar sola o se puede aplicar en un disolvente, tal como silicona de bajo peso molecular, hidrocarburos clorados o fluorados no tóxicos, por ejemplo, 1,1,2-tricloro-1,2,2-tifluoroetano, freón o disolventes de hidrocarburo convencionales tales como alcanos, tolueno, éter de petróleo y similares donde la toxicología no se considera importante. Posteriormente se extrae el disolvente
30 por evaporación. El revestimiento puede ser de cualquier espesor conveniente y, en la práctica, el espesor se determinará por tales factores como la cantidad aplicada, la viscosidad del lubricante, y la temperatura de aplicación. Por razones económicas, el revestimiento preferiblemente se aplica tan finamente como sea factible, puesto que no se gana ninguna ventaja significativa por revestimientos más espesos. El espesor exacto del revestimiento no parece ser crítico y revestimientos muy finos, es decir, de uno o dos μm presentan eficaces propiedades de lubricación. Mientras no sea necesario por operatividad, es deseable que el espesor del revestimiento sea
35 sustancialmente uniforme por todas partes. El revestimiento puede estar parcialmente o completamente reticulado después de la aplicación o parcialmente reticulado para unirse al sustrato, y entonces completamente reticulado más adelante.

40 La cámara revestida y/o el miembro sellador revestido se pueden someter a tratamiento oxidativo, por ejemplo, tratamiento por plasma. El tratamiento por plasma se puede llevar a cabo en cualquier equipo de vacío común o de generación de plasma atmosférico. Se puede usar cualquier plasma de ionización adecuado, como, por ejemplo, un plasma generado por una descarga luminosa o una descarga corona. El plasma se puede generar a partir de una diversidad de gases o sus mezclas. Los gases frecuentemente usados incluyen aire, hidrógeno, helio, amonio, nitrógeno, oxígeno, neón, argón, criptón y xenón. Se puede usar cualquier presión de gas, por ejemplo, presión atmosférica o 665 Pa (5 mm de Hg) o por debajo, tal como 13,3 Pa a 133 Pa (0,1 a 1,0 mm de Hg). En algunas realizaciones tales como los métodos oxidativos atmosféricos, el plasma de ionización se introduce directamente a partir de un pequeño puerto en la cámara o a través de la apertura posteriormente sellada por el miembro sellador. La superficie externa del miembro sellador revestido se puede tratar directamente de manera similar a los métodos
45 de tratamiento de corona o plasma actuales. En otras realizaciones, tal como equipo basado en vacío, el plasma se puede excitar alrededor del miembro sellador revestido o la cámara revestida y permitir que se difunda dentro los elementos de la cámara y del miembro sellador. Alternativamente, el plasma se puede excitar dentro del interior de la cámara abierta al controlar apropiadamente la posición del electrodo. Después del tratamiento oxidativo, la cámara tratada y/o el miembro sellador tratado se pueden someter a tratamiento por calor o irradiación con un isótopo (tal como radiación gamma), haz de electrón o radiación ultravioleta. Alternativamente, la cámara tratada y/o el miembro sellador tratado pueden ser tratados por calor vía horno o radiofrecuencia (RF). En el caso de reticulación por horno, las temperaturas pueden oscilar entre 120° y 140°C y el tiempo de permanencia en el horno es generalmente de 30 a 40 segundos, dependiendo de la formulación precisa. Si se usan técnicas RF, la espiral debería conducir calor suficiente para obtener una temperatura superficial de sustrato de 150° a 200°C. A estas
50 temperaturas, solamente se requieren de 2 a 4 segundos para el curado.

55 En algunas realizaciones, el revestimiento está al menos parcialmente reticulado por irradiación con un isótopo, haz de electrón o radiación ultravioleta. Esta técnica tiene la ventaja de esterilizar también, lo cual es útil en las aplicaciones médicas. La esterilización por radiación en la forma de radiación de ionización comúnmente se usa en hospitales para dispositivos médicos tales como catéteres, artículos de cirugía e instrumentos de cuidado crítico. La irradiación gamma ejerce un efecto microbicida al oxidar el tejido biológico, y por tanto proporciona un método simple, rápido y eficiente de esterilización. Los rayos gamma se usan o bien a partir de una fuente de isótopo de cobalto-60 (^{60}Co) o a partir de una fuente de electrón acelerado generado por máquina. Las suficientes exposiciones
60

se alcanzan cuando los materiales a esterilizar se mueven alrededor de una fuente de ^{60}Co expuesta durante un periodo de tiempo definido. La dosis más comúnmente usada para esterilizar artículos médicos es de 5 a 100 KGy, por ejemplo 5-50 kGy.

5 En algunas realizaciones, se puede aplicar una capa de lubricante superficial de 0,3 a 10, preferiblemente de 0,8 a 4,0 μm de espesor sobre el revestimiento de organopolisiloxano reticulado anteriormente descrito. El lubricante de superficie puede ser aceite de silicona convencional (organopolisiloxano) de viscosidad 10^{-4} a 1 (100 a 1.000.000); 10^{-4} a 6×10^{-2} (100 a 60.000); o preferiblemente 10^{-3} a $12,5 \times 10^{-3}$ m^2/s (1.000 a 12.500 cSt). La capa de lubricación superficial se puede aplicar mediante cualquiera de los métodos convencionales anteriormente descritos. Los métodos preferidos para aplicar el lubricante de superficie son mediante rociado o baño del tambor de la jeringuilla dentro de una disolución, 4% en peso, del lubricante de superficie en un disolvente tal como cloroformo, diclorometano o preferiblemente un clorofluorocarbono, tal como FREON™ TF. El lubricante de superficie opcionalmente puede estar ligeramente reticulado mediante tratamiento oxidativo y/o radiación.

10 15 En algunas realizaciones en las que tanto la cámara como el miembro sellador están revestidos con organopolisiloxanos, la viscosidad del organopolisiloxano que reviste la cámara puede ser mayor que la viscosidad del organopolisiloxano que reviste el miembro sellador. Por ejemplo, la viscosidad del organopolisiloxano que reviste la cámara puede ser de $12,5 \times 10^{-3}$ m^2/s (12.500 cSt), mientras que la viscosidad del organopolisiloxano que reviste el miembro sellador puede ser de 10^{-3} m^2/s (1.000 cSt). En otras realizaciones, la viscosidad del organopolisiloxano que reviste la cámara puede ser igual o menor que la viscosidad del organopolisiloxano que reviste el miembro sellador. Por ejemplo, la viscosidad del organopolisiloxano que reviste la cámara puede ser de $12,5 \times 10^{-3}$ m^2/s (12.500 cSt), mientras que la viscosidad del organopolisiloxano que reviste el miembro sellador puede ser de 0,1 m^2/s (100.000 cSt).

20 25 En algunas realizaciones, los artículos revestidos se someten a un tratamiento de esterilización. Muchas técnicas de esterilización están disponibles hoy en día para esterilizar dispositivos médicos para eliminar organismos vivos tales como bacterias, levaduras, moho y virus. Técnicas de esterilización comúnmente usadas para dispositivos médicos incluyen autoclave, óxido de etileno (EtO) o irradiación gamma, así como sistemas más recientemente introducidos que implican esterilizantes en fase de vapor y plasma de gas a baja temperatura.

30 35 La cámara del artículo médico está al menos parcialmente llenada con la disolución que comprende: (i) al menos un material proteínico; (ii) al menos un tensioactivo no iónico; y (iii) al menos un azúcar. Los componentes y cantidades de la disolución se han descrito anteriormente en detalle. Generalmente, la disolución se puede filtrar antes de llenar la cámara, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de 0,22 μm y se distribuye en la cámara estéril bajo condiciones asépticas bien conocidas por los expertos en la técnica.

La presente invención está más particularmente descrita en los siguientes ejemplos, los cuales intentan ser únicamente ilustrativos, ya que numerosas modificaciones y variaciones serán aparentes para los expertos en la técnica.

40 EJEMPLOS

Ejemplo A

45 Este ejemplo estudia los efectos de la sacarosa y un tensioactivo no iónico (tensioactivo no iónico de monolaurato de polioxietileno 20 sorbitán Tween 20®) sobre la agregación de anticuerpo monoclonal (mAb) trastuzumab Herceptin® y sobre las características de la gotita de aceite de silicona. En esta investigación, no se realizaron intentos de distinguir la adsorción de mAb a aceite de silicona de la agregación nucleada de mAb por aceite de silicona. En su lugar, cualquier asociación irreversible entre aceite de silicona y mAb simplemente se refiere como "agregación".

50 En este estudio se analizaron cuatro formulaciones, tal como se detalla en la Tabla 1. Cada formulación se analizó mediante escaneo de partícula activada por fluorescencia para determinar la composición de partícula. Para un subconjunto de estas formulaciones, se realizó análisis más completo. Se midieron la turbiedad de la suspensión, la concentración en número de gotita de aceite de silicona y la distribución por tamaño de gotita de aceite de silicona. Después de la filtración, se midieron las concentraciones de trastuzumab Herceptin® en el filtrado acuoso.

55 Se intercambiaron una disolución del anticuerpo monoclonal humanizado recombinante (rhAb, del Inglés "Recombinant Humanized Monoclonal Antibody") Herceptin® (trastuzumab, Genentech, Inc.) en acetato de sodio 10 mM, pH 5,0, mediante diálisis extensiva (Pierce Slide-A-Lyzer, 3500 MWCO). Se mezclaron volúmenes apropiados de disoluciones separadas de sacarosa y/o polisorbato 20 (Tween 20) con disoluciones purificadas de Herceptin® a una concentración final de mAb de 1 mg/ml. Se variaron sistemáticamente concentraciones de los aditivos de formulación (sacarosa, NaCl y tensioactivos) tal como se describe en las secciones de resultados apropiados. Todos los productos químicos son de categoría de reactivo o superior.

Tabla 1

Nº Formulación	Componente de Formulación			
	Aceite de Silicona (1% v/v)	mAb (1 mg/ml)	Sacarosa (0,5 M)	Tensioactivo no iónico Tween 20® (0,005%)
A	X	X		
B	X	X	X	
C	X	X		X
D	X	X	X	X

5 Se crearon suspensiones de aceite de silicona de categoría médica (aproximadamente 0,5% v/v) en tampón acuoso (acetato de sodio 10 mM, pH 5,0) mediante homogeneización a alta presión. Se añadió fluido médico de polidimetilsiloxano (Dow Corning 360, 10^{-3} m²/s (1000 cSt)) a un tampón acuoso y se pasó una vez a través de un homogeneizador de alta presión (Homogeneizador Emulsiflex C5 comercialmente disponible por Avestin, Inc.). Se crearon suspensiones finales para el análisis al mezclar disoluciones de mAb que contenían aditivos de formulación con suspensiones de aceite de silicona en tampón siguiendo inmediatamente la homogeneización.

10 Después de variar los periodos de incubación, se filtraron las suspensiones (Whatman Anotop 10, filtro de jeringuilla de 0,02 μ m) para separar las fases acuosas y de aceite. Justo antes de la filtración, las suspensiones se mantuvieron durante aproximadamente 2 min. para permitir que las gotitas de aceite sedimentaran cerca de la membrana de filtro. Como control para ensayar el grado de separación de fase, se midió la fluorescencia de nitrato acuoso después de marcar el aceite de silicona con tinte Rojo Nilo. Las insignificantes mediciones de fluorescencia a 628 nm demostraron separación adecuada.

15 Se midieron las densidades ópticas de dos tipos de muestra con un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 35 (Wellesley, MA). Después de agitación breve y suave para someter a desfloculación los aglomerados de gotita, se midieron las densidades ópticas de la suspensión homogénea de aceite de silicona a 660 nm en función del tiempo y condición de formulación. En el filtrado acuoso, se midió la absorbancia de mAb a 280 nm para determinar las concentraciones de mAb. Alternativamente, se midieron las concentraciones de mAb con un ensayo de unión a tinte Coomassie (Coomassie Plus™ Better Bradford Assay Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

20 Se midieron las distribuciones de tamaño de gotita de aceite de silicona usando un analizador de tamaño de partícula de difracción por láser Coulter LS230 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Se midieron las distribuciones de tamaño relativas para suspensiones inmediatamente después de la homogeneización y en función del tiempo hasta 2 semanas después de la preparación de la suspensión. A partir de las concentraciones en número y las distribuciones de tamaño relativas de gotita de aceite de silicona, se estimó el área superficial del aceite de silicona.

25 Se puede usar el escaneo de partícula activada por fluorescencia para analizar el tamaño de partícula, morfología y fluorescencia de partícula relativa. Solamente partículas de un tamaño umbral (diámetro > 1 μ m) son analizadas por la técnica. Para las partículas escaneadas, se midieron la dispersión de luz frontal (FSC, dispersión de luz a 180°), dispersión de luz lateral (SSC, dispersión de luz a 90°), intensidad de fluorescencia del verde (FL1, 525-585 nm) e intensidad de fluorescencia del rojo (FL2, 585-600 nm). Las moléculas de trastuzumab Herceptin® se marcaron químicamente con tinte Alexa Fluor® 488 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) de acuerdo con los protocolos bien documentados (MP 00143, "Amine-Reactive Probes", Invitrogen Corporation). Para marcar el aceite de silicona, se disolvió tinte Rojo Nilo en aceite de silicona a 5 mg/ml. Rojo Nilo, 9-dietilamino-5-benzofenoxazin-5-ona, es un tinte extremadamente hidrófobo cuya fluorescencia se apaga completamente en agua. El tinte Alexa Fluor® 488 tiene un máximo de emisión de 519 nm, y el tinte Rojo Nilo tiene un máximo de emisión de 628 nm. Se escanearon las suspensiones con mAb químicamente marcado y aceite de silicona tintado con un analizador de Citómetro de Flujo BD FACScan™ (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ).

30 El grado al cual trastuzumab Herceptin® interactúa con las gotitas de aceite de silicona en suspensión depende del entorno de formulación y el tiempo de incubación. Las Figuras 1A y 1B ilustran la asociación de mAb con aceite de silicona. Los símbolos son medias aritméticas de tres réplicas medidas mediante la diferencia entre la concentración de mAb inicial y la concentración de mAb en el filtrado. Las barras de error representan ± 1 la desviación estándar. En todas las series, la concentración de mAb es de 1 mg/ml. En ambos paneles, los cuadrados indican formulaciones con sacarosa 0,5 M, mAb y aceite de silicona. En la Figura 1A, los triángulos indican formulaciones con solamente mAb y aceite. En la Figura 1B, los triángulos indican formulaciones con sacarosa 0,5 M, tensioactivo no iónico Tween 20® al 0,005%, mAb y aceite.

35 Después de la suspensión, incubación y filtración, las formulaciones con sacarosa contenían mayores concentraciones de mAb en filtrado acuoso que aquellas sin sacarosa a tiempos de incubación suficientemente

largos. Por tanto, la presencia de sacarosa reduce la agregación de mAb a tiempos largos, tal como se muestra en la Figura 1A. La Figura 1B compara la formulación con sacarosa mostrada en el panel A con una formulación que contenía sacarosa y tensioactivo no iónico. La adición de tensioactivo no iónico redujo además la asociación de mAb con aceite de silicona.

5 Al medir las intensidades de fluorescencia de partículas que contienen mAb marcado y aceite de silicona marcado, se pueden entender mejor los efectos de los aditivos de formulación sobre la agregación de mAb. Las Figuras 2A-2D ilustran los diagramas de dispersión de la intensidad de fluorescencia de dos bandas de longitud de onda. En las Figuras 2A-2D, la intensidad FL1 es directamente proporcional a la concentración de mAb marcado con Alexafluor 10 488. La intensidad de fluorescencia FL2 es directamente proporcional al volumen de aceite de silicona marcado con Rojo Nilo. Las intensidades FL1 y FL2 están en escala más o menos con el tamaño de partícula, abarcando un intervalo de tamaño mayor que el de un orden de magnitud. Los ajustes experimentales se optimizaron de modo que las intensidades relativas de mAb y aceite de silicona fueran equivalentes a en la Figura 2A. Estos ajustes se 15 mantuvieron durante todas las otras formulaciones (Figuras 2B-2D). Por tanto, las pautas dentro y las comparaciones entre paneles son significativas; los valores de intensidad absolutos no lo son. Las unidades de los ejes son arbitrarias. Los histogramas representan distribuciones de intensidad de partícula. Las escalas del histograma oscilan entre 0 y 0,5. Las Figuras 2A-2D representan formulaciones de 1 mg/ml de mAb y aceite de 20 silicona con diversas combinaciones de sacarosa y tensioactivos: A ni sacarosa ni tensioactivo; B sacarosa 0,5 M; C tensioactivo no iónico Tween 20® al 0,005%; y D sacarosa 0,5 M y tensioactivo no iónico Tween 20® al 0,005%.

Cada una de las Figuras 2A-2D corresponden a la formulación con la misma letra en la Tabla 1. Por tanto, los dos paneles de la izquierda (Figs 2A y 2C) representan formulaciones sin sacarosa. Los dos paneles de la derecha (Figuras 2B y 2D) representan formulaciones que contienen sacarosa. De arriba a abajo, los paneles representan no 25 tensioactivo (Figuras 2A y 2B) y tensioactivo no iónico (Figuras 2C y 2D).

La Figura 2A muestra intensidades de partícula para una formulación que contiene solamente mAb y aceite de silicona. El diagrama de dispersión es lineal a través de un orden de magnitud en tamaño (aproximadamente 1-10 30 μm), indicando que la relación entre la concentración de mAb y el volumen de aceite de silicona es constante para partículas de diferentes tamaños. La adición de tensioactivo no iónico Tween 20® (Figura 2C) no afecta significativamente a las intensidades FL1 o FL2. Cuando se introduce sacarosa en la formulación (paneles derechos), generalmente se comprimen los intervalos en la intensidad de fluorescencia. Es más, la presencia combinada de sacarosa y tensioactivo no iónico Tween 20® mayormente reduce la agregación de mAb: más de la 35 mitad de las partículas registran insignificante intensidad FL1 (Figura 2D). En la Figura 2B, las pautas de datos múltiples sugieren dos o más distintas poblaciones de partícula.

Las desviaciones de la línea en el diagrama de dispersión demuestra que cuando las gotitas aumentan en tamaño, los regímenes existen donde el crecimiento de partícula no es lineal. En su lugar, parece que existen diferencias en 40 la rugosidad de superficie para partículas de esencialmente el mismo tamaño. Aunque sin estar obligados por ninguna teoría, una explicación plausible del crecimiento de partícula no lineal, no esférico es que las partículas crecen por adición de gotitas más pequeñas sin coalescencia inmediata. Este efecto de "flotación" ("creaming") crea partículas que son aglomerados multi-gotita. El escaneo de fluorescencia permite la medición de las contribuciones de anticuerpo/aceite a partículas como aglomerado de partículas.

A medida que las partículas crecen en tamaño (correspondiendo a un aumento en las intensidades del rojo y el verde) la relación entre anticuerpo y aceite permanece generalmente constante. Esto soporta la hipótesis de que 45 gotitas de aceite más pequeñas se combinan para formar partículas multi-gotita mayores. Parece que las moléculas anticuerpo absorbidas a la superficie de pequeñas gotitas de aceite de silicona permanecen asociadas con el aceite de silicona como aglomerado de gotitas para formar partículas mayores.

Las Figuras 3A-3D son diagramas de dispersión de la dispersión de luz lateral (dispersión de luz a 90°) frente a dispersión de luz frontal (dispersión de luz a 180°) de gotitas de aceite de silicona en formulaciones de mAb acuosas 50 (1 mg/ml) que contienen diversas combinaciones de sacarosa y tensioactivos para las mismas cuatro formulaciones A-D (véase Tabla 1). La intensidad de dispersión de luz frontal está principalmente afectada por el tamaño de partícula, mientras que la intensidad de dispersión de luz lateral está influenciada por el tamaño de partícula y la rugosidad de superficie. Las unidades de los ejes son arbitrarias. Los histogramas representan distribuciones de 55 partícula. Las escalas del histograma oscilan entre 0 y 0,5. Las Figuras 3A-3D representan formulaciones de 1 mg/ml de mAb y aceite de silicona con diversas combinaciones de sacarosa y tensioactivos: A ni sacarosa ni tensioactivo, B sacarosa 0,5 M, C tensioactivo no iónico Tween 20® al 0,005%, y D sacarosa 0,5 M y tensioactivo no iónico Tween 20® al 0,005%. Tal como se muestra en las Figuras 3B y 3D, la adición de sacarosa reduce mucho el tamaño de partícula medio (eje "x") y la rugosidad de superficie (eje "y"). 60

Los índices relativos de la coalescencia del aceite de silicona están trazados en las Figuras 4A y 4B. Las Figuras 4A y 4B muestran la dependencia de tiempo del oscurecimiento de la luz en las formulaciones de mAb con aceite de

silicona suspendido. Las muestras de cada formulación se analizaron después de dar vueltas brevemente para someter a las suspensiones a desfloculación y eliminación de flotación. El punto de tiempo inicial de cada formulación se normalizó al mismo valor. Los símbolos son medias aritméticas de tres réplicas y las barras de error representan la ± 1 desviación estándar. En cada una de las Figuras 4A y 4B, la concentración de mAb es de 1 mg/ml. En las Figuras 4A y 4B, los cuadrados indican formulaciones con sacarosa 0,5 M, mAb y aceite de silicona. En la Figura 4A, los triángulos indican formulaciones con solamente mAb y aceite. La Figura 4A compara formulaciones de mAb y aceite de silicona con y sin sacarosa. Tal como se muestra en la Figura 4A, la sacarosa aumentó el índice de coalescencia del aceite de silicona. En la Figura 4B, los triángulos indican formulaciones con sacarosa 0,5 M, tensioactivo no iónico Tween 20® al 0,005%, mAb y aceite. La Figura 4B compara formulaciones con sacarosa con formulaciones con sacarosa y un tensioactivo no iónico. Tal como se muestra en la Figura 4B, los tensioactivos no iónicos Tween 20® redujeron los índices de coalescencia del aceite de silicona. Por tanto, las gotitas de aceite suspendidas permanecían en disolución más tiempo cuando estaba presente el tensioactivo no iónico Tween 20® y menos tiempo cuando estaba presente sacarosa.

Después de estimar el área superficial del aceite de silicona en cada formulación a cada punto de tiempo, se puede calcular la agregación de mAb normalizada por área superficial (Figuras 5A-5B). Cada una de las Figuras 5A-5B corresponden al mismo panel en la Figura 1, modificado para representar el área superficial de aceite de silicona. Los símbolos son medias aritméticas de tres replicas medidas mediante la diferencia entre concentración de mAb inicial y concentración de mAb en el filtrado. Las diferencias se dividen entre las áreas superficiales de aceite de silicona específicas a formulación y tiempo. Las barras de error representan la ± 1 desviación estándar. En cada una de las Figuras 5A y 5B, la concentración de mAb es de 1 mg/ml. En todos los paneles, las líneas discontinuas representan una estimación de la cobertura de la monocapa y los cuadrados indican formulaciones con sacarosa 0,5 M, mAb y aceite de silicona. En la Figura 5A, los triángulos indican formulaciones con solamente mAb y aceite. En la Figura 5B, los triángulos indican formulaciones con sacarosa 0,5 M, tensioactivo no iónico Tween 20® al 0,005%, mAb y aceite. Normalizada por el área superficial del aceite de silicona, la agregación de mAb actualmente aumenta en presencia de sacarosa a tiempos suficientemente largos, tal como en la Figura 5A. En formulaciones que contienen sacarosa y tensioactivo no iónico Tween 20®, los niveles de asociación mAb/aceite permanecen bajos y relativamente constantes (Figura 5B).

Tal como se muestra en las anteriores Figuras, los aditivos de formulación pueden influir en la coalescencia de gotita de aceite de silicona, los niveles de exposición de mAb a aceite de silicona, y la agregación de mAb. Además, los efectos combinados de dos o más aditivos de formulación son a veces más significativos que los efectos separados de cada uno. Especialmente, las formulaciones que contienen tanto sacarosa como tensioactivo no iónico Tween 20® reducen eficazmente la asociación de mAb con aceite de silicona, y la adición de sacarosa a formulaciones altera marcadamente las características de la gotita de aceite de silicona.

Aunque sin estar obligados por ninguna teoría, el mecanismo por medio del cual la sacarosa reduce la asociación de mAb con aceite de silicona se cree que está conducido por la coalescencia. En el ejemplo anterior, la sacarosa aumenta el índice de coalescencia del aceite de silicona, tal como se muestra en la Figura 4A. A medida que las gotitas se fusionan, el área superficial del aceite de silicona disminuye. Puesto que el área superficial reducido está disponible en formulaciones con sacarosa, los índices de agregación de mAb decaen a tiempos suficientemente largos (Figura 1A). Curiosamente, la sacarosa aumenta el alcance de la asociación mAb/aceite de silicona por unidad de superficie de aceite de silicona (Figura 5A). Aún así, los índices de agregación completa mejoran debido a la coalescencia aumentada. Por tanto, la adición de sacarosa a formulaciones de mAb terapéuticas es beneficioso no solamente para la estabilización de mAb, sino potencialmente para reducir su exposición a superficies de aceite de silicona.

La adición de tensioactivo no iónico Tween 20® a formulaciones que contienen sacarosa puede reducir además los niveles de asociación mAb/aceite. Este efecto es especialmente evidente a tiempos cortos (Figura 4B). Curiosamente, la eficacia del tensioactivo no iónico Tween 20® en la inhibición de la asociación mAb/aceite es aumentada por la copresencia de sacarosa, tal como se muestra en las Figuras 2C y 2D. En ausencia de sacarosa, los diagramas de dispersión de la intensidad de fluorescencia para formulaciones con tensioactivo no iónico Tween 20® (Figura 2C) no difieren significativamente de aquellos sin tensioactivo no iónico Tween 20® (Figura 2A). Sin embargo, cuando el azúcar y el tensioactivo no iónico están ambos presentes en la formulación (Figura 2D), se aumenta la reducción en la asociación mAb/aceite.

El mecanismo por el cual la sacarosa y el tensioactivo no iónico Tween 20® previenen juntos la agregación de mAb difiere del de sacarosa sola. Tal como se evidencia en la Figura 4B, la adición de tensioactivo no iónico Tween 20® a formulaciones que contienen sacarosa ralentiza los índices de coalescencia de aceite. A partir de las mediciones de tamaño de gotita y concentración en número, el área superficial de aceite de silicona suspendido permanece relativamente constante hasta 2 semanas después de la homogeneización. Las formulaciones con sacarosa y tensioactivo no iónico Tween 20® inhiben la agregación de mAb, presentando casi un factor de 2 reducción en la agregación sobre la próxima mejor formulación con sacarosa pero sin tensioactivo no iónico Tween 20® (Figura 5B).

Puesto que los gráficos de puntos de la dispersión de luz de suspensiones de aceite de silicona sin mAb parecen casi idénticos a los mostrados en las Figuras 3 y 4, los perfiles de diagrama de dispersión principalmente revelan información sobre características de la gotita de aceite de silicona, concretamente floculación y coalescencia.

5 Aumentos conducidos por sacarosa en los índices de coalescencia de aceite de silicona y flotación influyen en estos gráficos de puntos. En formulaciones con sacarosa, las gotitas son más pequeñas, tienen menos complejidad de superficie, y tienen un intervalo de tamaño más ajustado que en las formulaciones sin sacarosa.

10 En formulaciones sin sacarosa en la Figura 3, las pautas de datos restringidas son de interés. Hipotéticamente, partículas esféricas perfectamente suaves de tamaño variante crearán una pauta lineal, siempre y cuando la dispersión de luz perpendicular esté óptimamente calibrada. Las variaciones a partir de la línea indican desviación de forma de la esférica. Aunque sin estar obligados por ninguna teoría, se cree que las desviaciones observadas en este estudio resultan de la floculación de gotita sin coalescencia inmediata. Por tanto, las partículas grandes compuestas de gotitas esféricas más pequeñas presentan complejidad de superficie que no existe con partículas esféricas. La Figura 6 es la representación hipotética de la distribución de gotita de aceite de silicona y aglomerado basada en la dispersión de luz frontal y lateral. Una pauta lineal (línea punteada) resultaría de gotitas esféricas de diámetro variante. Las desviaciones de la línea en el perfil del diagrama de dispersión se pueden explicar por la aglomeración de gotita sin coalescencia inmediata.

20 La presencia de aglomerados persistentes de gotitas (es decir, flóculo que no se fusiona rápidamente) puede explicar otros fenómenos observados en esta investigación. Las distribuciones de tamaño de partícula medidas por el oscurecimiento de luz de flujo laminar (probablemente induciendo desfloculación) consistentemente revelaron intervalos más ajustados en el tamaño de gotita que las mediciones por escaneo de partícula activada por fluorescencia. Adicionalmente, en muchas formulaciones sin sacarosa, la relación entre concentración de mAb y volumen de aceite de silicona era relativamente constante a lo largo de un amplio intervalo en tamaño de partícula. Con coalescencia lenta, el mAb absorbido no necesariamente es expulsado de las superficies de aceite de silicona tras la floculación. Después, la concentración de mAb puede crecer linealmente con el volumen del aglomerado de aceite de silicona en lugar del área superficial.

30 Las pautas repartidas en los diagramas de dispersión de FL1 frente a FL2 se pueden explicar por la presencia de poblaciones separadas de partículas. Estas pautas ocurren en formulaciones con sacarosa (Figura 2B). Dependiendo de las condiciones de formulación, pueden existir combinaciones de varias poblaciones de partícula: agregados de mAb sin aceite de silicona, agregados de mAb con un núcleo de aceite de silicona y aglomerados de gotita de aceite de silicona con mAb adsorbido a superficies de gotita. Es posible que las bolsas ("pockets") hidrófobas de agregados de mAb retiren el tinte Rojo Nilo del aceite de silicona. Alternativamente, una gotita de aceite de silicona podría actuar como un núcleo para la agregación de mAb.

40 Las formulaciones de mAb terapéuticas que contienen sacarosa y tensioactivo no iónico Tween 20® reducen notablemente la agregación de mAb en presencia de aceite de silicona. Para un alcance más pequeño, formulaciones con solamente sacarosa reducen la agregación de mAb, probablemente debido a los índices aumentados de coalescencia de aceite de silicona. Puesto que se ha demostrado que la contaminación de aceite de silicona induce agregación de proteína, las estrategias exitosas de formulación para reducir la agregación de proteína pueden ser importantes para productos expuestos a aceite de silicona. La adición de sacarosa a formulaciones de proteína terapéuticas puede reducir la exposición de proteína a superficies de aceite de silicona. Tal como se muestra en el Ejemplo anterior, formulaciones que contienen sacarosa y un tensioactivo no iónico pueden inhibir la agregación de proteína inducida por aceite de silicona.

Ejemplo B

Efecto de la viscosidad del aceite sobre la carga de aceite en suspensión

50 Se añadió aceite de silicona de categoría médica a disoluciones acuosas con y sin tensioactivo no iónico tal como se muestra en la Tabla 2. La concentración y la viscosidad del aceite de silicona en cada muestra están expuestas en la Tabla 2 de a continuación. La Figura 7 muestra la influencia de la viscosidad del aceite sobre la carga de aceite indirectamente mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm. La densidad óptica a 600 nm (OD_{600} , del Inglés "Optical Density") es una medida indirecta de la concentración de aceite suspendido. Tal como se muestra en la Figura 7 y la Tabla 2, menor viscosidad de aceite refleja mayor OD_{600} inicial, lo cual sucesivamente permite mayor carga de aceite. Tal como se muestra en las Figuras 8 y 9, no hubo diferencia cualitativa en el comportamiento de coalescencia de las gotitas de aceite suspendido de polidimetilsiloxano de viscosidad diferente (10^{-3} m²/s frente a $12,5 \times 10^{-3}$ m²/s (1.000 cSt frente a 12.500 cSt)) para las muestras ensayadas.

60

Tabla 2

Tipo de Aceite ($C_{\text{aceite}}=0,5\%$)	OD ₆₀₀ Inicial (au)
$3,5 \times 10^{-4} \text{ m}^2/\text{s}$ (350 cSt)	0,21
$10^{-3} \text{ m}^2/\text{s}$ (1.000 cSt)	0,12
$12,5 \times 10^{-3} \text{ m}^2/\text{s}$ (12.500 cSt)	0,04
$3,5 \times 10^{-4} \text{ m}^2/\text{s}$ (350 cSt) 0,1% Tween 20®	0,53
$10^{-3} \text{ m}^2/\text{s}$ (1.000 cSt) 0,1% Tween 20®	0,13
$12,5 \times 10^{-3} \text{ m}^2/\text{s}$ (12.500 cSt) 0,1% Tween 20®	0,16

5 Ejemplo C

Se marcó aceite de silicona tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo A disolviendo tinte Rojo Nilo en aceite de silicona a 5 mg/ml. El anticuerpo monoclonal usado en el estudio era el estándar comercialmente disponible mAb anti CD4 humano de Ratón Pacific Blue® (clon RPA-T4, Becton, Dickinson and Company). El tinte Pacific Blue® tiene un máximo de emisión de 455 nm. El tinte Rojo Nilo tiene un máximo de emisión de 628 nm, sin embargo la señal de emisión de Rojo Nilo significativa ocurre en el detector normalmente usado para R-ficoeritrina (PE), y fue el detector de emisión usado para muestras marcadas con Rojo Nilo para este Ejemplo C. Las suspensiones con mAb marcado con Pacific Blue® y aceite de silicona marcado con Rojo Nilo se prepararon tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo A y se analizaron con un analizador de Citómetro de Flujo BD™ LSR II (Becton, Dickinson and Company) usando excitación por laser violeta (405 nm) para la detección de Pacific Blue® (filtro 450/50 BP) y excitación por laser azul (488 nm) para la detección de Rojo Nilo (filtro 585/42 BP). Todas las mediciones de fluorescencia se hicieron usando área de pulso para asegurar que se medía la fluorescencia total para cada partícula. Para mostrar apropiadamente las distribuciones de fluorescencia a lo largo de un amplio intervalo dinámico (4 décadas) incluso se permite que los valores cero y negativos se muestren como apropiados, se usó la transformación biexponencial (Logicle, DR Parks, WA Moore, Stanford University) de dentro del programa informático BD Diva.

El grado al cual el anticuerpo CD4 marcado interactúa con las gotitas de aceite de silicona en suspensión depende del entorno de formulación y el tiempo de incubación. Las Figuras 12A-12D ilustran la asociación de mAb tanto con silicona no marcada como con aceite de silicona marcado con Rojo Nilo. En todas las muestras que contenían mAb, la concentración de mAb era de 2 µg/ml.

Ahora en referencia a las Figuras 13A y 13B, la pendiente de la señal de Pacific Blue® del mAb marcado en función de la señal de Rojo Nilo (Figura 13B) estaba muy cerca del teórico ideal para el área superficial en función del volumen (Figura 13A). En teoría, para una esfera perfecta la pendiente del área superficial en función del volumen es de 10 elevado a dos tercios ($10^{0,667}$), y la pendiente observada era de $10^{0,603}$, de acuerdo con la expectativa de que el mAb está presente sobre el exterior de las gotitas de aceite o partícula en lugar de estar capturado o distribuido en el interior de la partícula de aceite. Si el mAb estuviera distribuido de una manera lineal con las gotitas de aceite marcadas con Rojo Nilo, la pendiente estaría cerca de 1,0 sobre o bien un diagrama logarítmico o sobre la parte logarítmica de una manifestación biexponencial.

El efecto del tensioactivo no iónico sobre la separación de partículas de aceite de silicona de partículas de mAb y aglomerados de aceite de silicona y partículas de mAb se muestra en las Figuras 14A y 14B. La Figura 14A es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo y anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ de acuerdo con la presente invención. La Figura 14B es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo, anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™, y tensioactivo no iónico de monolaurato de polioxietileno 20 sorbitán Tween 20® al 0,03% de acuerdo con la presente invención. Después de la correlación de la línea base digital, los valores de fluorescencia relativa esencialmente equivalen a los resultados e indican la fuerza de la señal, con

poblaciones que no tienen señal detectable teniendo una tendencia central cerca del cero con mitad de los valores negativos y mitad de los valores positivos. La transformación biexponencial es una transformación normalizadora de varianza que permite que los valores cero y negativos se manifiesten en el extremo inferior de la escala basada en la varianza de la población más tenue, transición suave a log, y la mayoría del intervalo de manifestación equivalente a una escala log estándar. Tal como se muestra en la Figura 14B, el tensioactivo no iónico Tween 20® es eficaz en la inhibición de la asociación mAb/aceite.

El efecto del tensioactivo no iónico sobre la separación de partículas de aceite de silicona de partículas de mAb y aglomerados de aceite de silicona y partículas de mAb se muestra en las Figuras 15A y 15B. La Figura 15A es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje “y”) frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje “x”) para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo y anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ de acuerdo con la presente invención. La Figura 15B es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje “y”) frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje “x”) para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo, anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ y tensioactivo no iónico de monolaurato de polioxietileno 20 sorbitán Tween 20® al 0,03% de acuerdo con la presente invención añadido después de exponer la proteína marcada a la gotita de aceite. Tal como se muestra en la Figura 15B, el tensioactivo no iónico Tween 20® es eficaz en la inhibición de la asociación mAb/aceite.

Los efectos del tensioactivo no iónico, sal y azúcar sobre la separación de partículas de aceite de silicona de partículas de mAb y aglomerados de aceite de silicona y partículas de mAb se muestran en las Figuras 16A-16D. La Figura 16A es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje “y”) frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje “x”) para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo y anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ de acuerdo con la presente invención. La Figura 16B es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje “y”) frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje “x”) para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo, anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ y sal de NaCl 150 mM de acuerdo con la presente invención. Tal como se muestra por comparación de las Figuras 16A (formulación sin sal) y 16B (formulación con sal), la presencia de sal de NaCl no pareció inhibir la asociación mAb/aceite.

La Figura 16C es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje “y”) frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje “x”) para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo, anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ y sacarosa 0,5 M de acuerdo con la presente invención. Tal como se muestra por comparación de las Figuras 16A (formulación sin sacarosa) y 16C (formulación con sacarosa), la presencia de sacarosa no parece inhibir la asociación mAb/aceite.

La Figura 16D es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje “y”) frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje “x”) para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo, anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™, sacarosa 0,5 M, sal 150 mM y tensioactivo no iónico de monolaurato de polioxietileno 20 sorbitán Tween 20® al 0,03% de acuerdo con la presente invención. Tal como se muestra por comparación de las Figuras 16A (formulación sin sal, sacarosa o tensioactivo no iónico) y 16D (formulación con sal, sacarosa y tensioactivo no iónico Tween 20®), la presencia de sal, sacarosa y tensioactivo no iónico Tween 20® inhibió la asociación mAb/aceite.

En el escaneo de partícula activada por fluorescencia, la ventana de pulso electrónico es la ventana del momento (“timing window”) (ventana de análisis, “window gate”) lo cual permite que las señales se procesen dentro de un marco especificado de tiempo. Normalmente esto se fija a un valor constante prudente (de acuerdo con las instrucciones del fabricante para un instrumento particular, con frecuencia varios microsegundos más largos que lo mínimamente requerido) durante la adquisición de datos para asegurar la integración completa de los pulsos. Se evaluó el efecto del descenso del tiempo a solamente el requerido para integrar completamente las señales sobre un sistema finamente calibrado (al ajustar la extensión de ventana) a 10 μ s frente a 2 μ s para muestras con y sin tensioactivo no iónico. La Figura 17A es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje “y”) frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje “x”) para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo y anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ medido a una extensión de ventana de 10 μ s de acuerdo con la presente invención. La Figura 17B es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje “y”) frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje “x”) para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo, anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ y tensioactivo no iónico de monolaurato de polioxietileno 20 sorbitán Tween 20® al 0,03% medido a

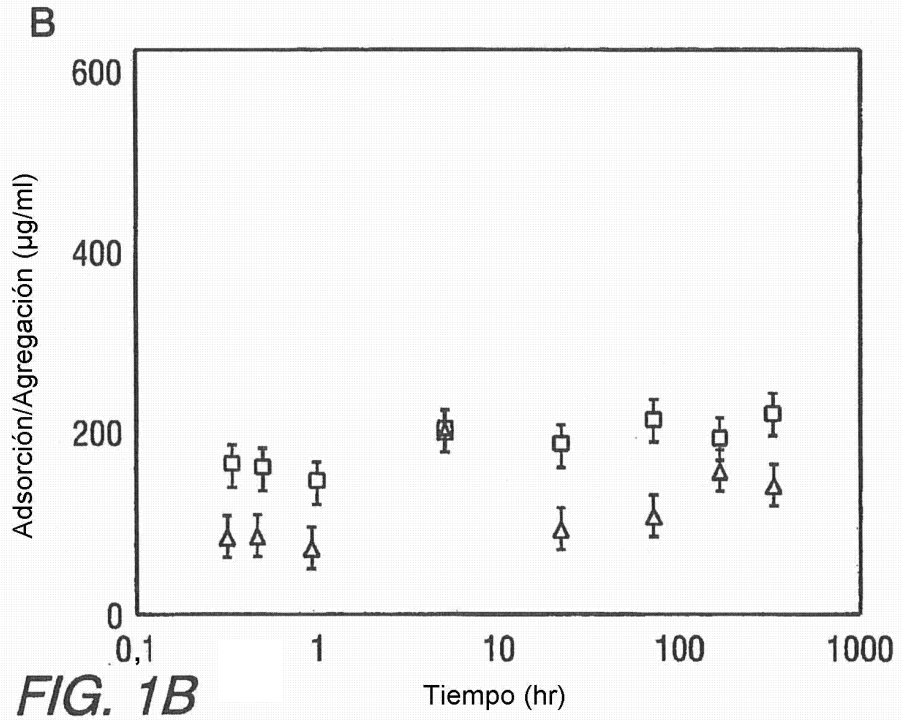
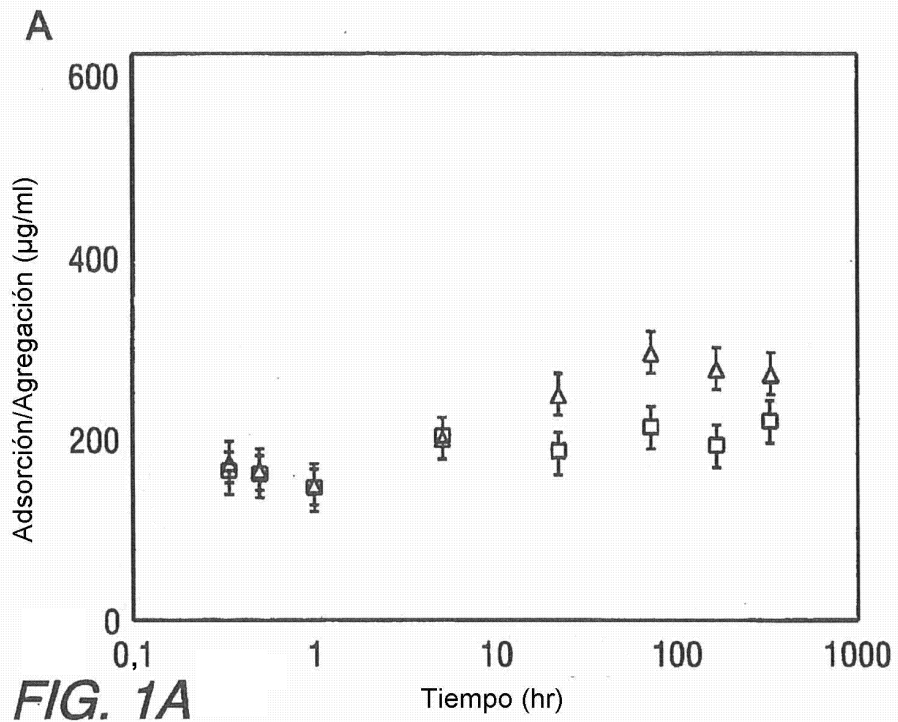
- una extensión de ventana de 10 μs de acuerdo con la presente invención. La Figura 17C es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo y anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ medido a una extensión de ventana de 2 μs de acuerdo con la presente invención. La Figura 17D es un diagrama de la intensidad de fluorescencia relativa del anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ (eje "y") frente a la intensidad de fluorescencia relativa del aceite de silicona marcado con Rojo Nilo (eje "x") para una muestra de aceite de silicona marcado con tinte Rojo Nilo, anticuerpo CD3 marcado con tinte Pacific Blue™ y tensioactivo no iónico de monolaurato de polioxietilen 20 sorbitán Tween 20® al 0,03% medido a una extensión de ventana de 2 μs de acuerdo con la presente invención. Tal como se muestra por comparación de las Figuras 17A y 17C, y las Figs, 17B y 17D, respectivamente, el descenso de la extensión de ventana de 10 μs a 2 μs reduce el coeficiente de variación (CV) de la población en ambas dimensiones de tinte.
- La presente invención se ha descrito en referencia a detalles específicos de sus realizaciones particulares. No se intenta que tales detalles se consideren como limitaciones sobre el alcance de la invención excepto en la medida en que y hasta el punto de estar incluidas en las reivindicaciones acompañantes.

REIVINDICACIONES

1. Un artículo médico, que comprende:
 - 5 (a) un recipiente que comprende una cámara para recibir una disolución, en el que la superficie interior de la cámara tiene un revestimiento sobre la misma preparado a partir de una composición que comprende un organopolisiloxano que tiene una viscosidad que oscila entre 10^{-4} y $1 \text{ m}^2/\text{s}$ (100 y 1.000.000 centistokes) antes del curado; y
 - 10 (b) una disolución que comprende:
 - (i) al menos un material proteínico que comprende un anticuerpo monoclonal, Factor Estimulador de Colonia de Granulocito, eritropoyetina, interferón y/o aquellos para terapia de artritis reumatoide; y
 - (ii) al menos un tensioactivo no iónico; y
 - 15 (iii) al menos un azúcar, en la que el azúcar se selecciona entre el grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y sus mezclas.
2. El artículo médico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cámara se selecciona entre el grupo que consiste en un tambor de jeringuilla, recipiente cartucho de fármaco, recipiente inyector sin aguja, recipiente dispositivo dispensador de líquido y recipiente dispositivo medidor de líquido.
- 20 3. El artículo médico de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la cámara es un tambor de jeringuilla.
4. El artículo médico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cámara está formada de vidrio, metal, cerámica, plástico, caucho o combinaciones de los mismos.
- 25 5. El artículo médico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cámara está preparada de un polímero olefínico seleccionado entre el grupo que consiste en polietileno, polipropileno, poli(1-buteno), poli(2-metil-1-penteno) y poliolefinas cíclicas.
- 30 6. El artículo médico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el organopolisiloxano es polidimetilsiloxano.
7. El artículo médico de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo además un miembro sellador que tiene una superficie exterior en el compromiso de deslizamiento con al menos una parte de la superficie interior de la cámara.
- 35 8. El artículo médico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el organopolisiloxano y el material proteínico está fluorescentemente marcado.
- 40 9. El artículo médico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el anticuerpo monoclonal se selecciona entre el grupo que consiste en infliximab, basiliximab, abciximab, daclizumab, gemtuzumab, alemtuzumab, rituximab, palivizumab, trastuzumab y etanercept.
- 45 10. El artículo médico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el organopolisiloxano está marcado con un primer resto fluorescente que emite luz dentro de un primer intervalo de longitudes de onda y el material proteínico está marcado con un segundo resto fluorescente que emite luz dentro de un segundo intervalo de longitudes de onda cuando el primer resto fluorescente y el segundo resto fluorescente están cada uno expuestos a luz de la misma longitud de onda emitida por un láser, en el que el primer intervalo de longitudes de onda se superpone con el segundo intervalo de longitudes de onda menos del 5% en base al intervalo normalizado combinado total de longitudes de onda del primer intervalo de longitudes de onda y el segundo intervalo de longitudes de onda.
- 50 11. El artículo médico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el organopolisiloxano está marcado con resto fluorescente Rojo Nilo que no se excita cuando se expone a un láser violeta de 405 nm y por lo tanto no emite luz a lo largo de un intervalo de 450 nm a 650 nm y el material proteínico está marcado con tinte Pacific Blue que emite luz a lo largo de un intervalo de 340 nm a 450 nm cuando se expone a un láser violeta de 405 nm.
- 55 12. El artículo médico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tensioactivo no iónico está seleccionado entre el grupo que consiste en glicoles acetilénicos, alcanolamidas, alcanolaminas, alquil fenoles, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, ésteres de glicerol, monododecil éteres, derivados de fenol, poloxámeros, poloxaminas, polioxietilen acil éteres, polioxietilenglicol dodecil éteres, dodecil sulfatos de sodio, sorbitoles, derivados de sorbitán y sus mezclas.
- 60

13. El artículo médico de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el tensioactivo no iónico es un derivado de sorbitán seleccionado entre el grupo que consiste en ésteres de ácido graso de sorbitán, ésteres de ácido graso de polioxietilen sorbitán y sus mezclas, preferiblemente en el que el tensioactivo no iónico es un éster de ácido graso de polioxietilen sorbitán y que comprende además un azúcar que es sacarosa.

5 14. El artículo médico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el azúcar se selecciona entre el grupo que consiste en sacarosa, lactosa, fructosa, glucosa, galactosa, trehalosa, manosa y sus mezclas.



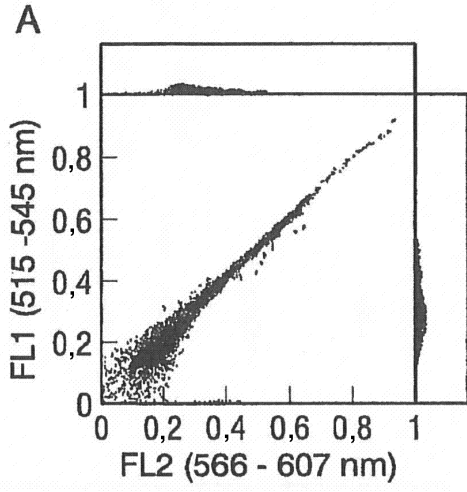


FIG. 2A

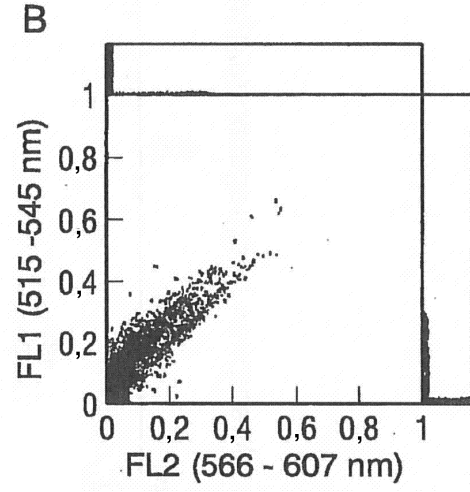


FIG. 2B

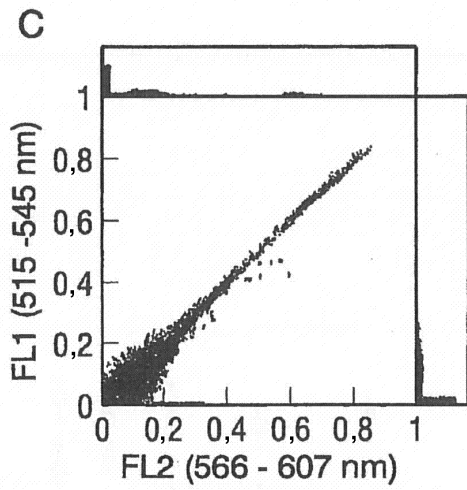


FIG. 2C

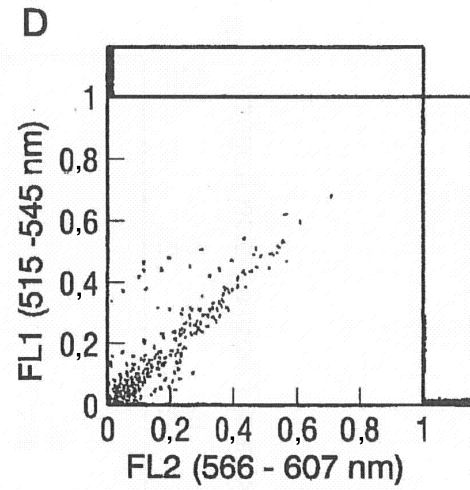


FIG. 2D

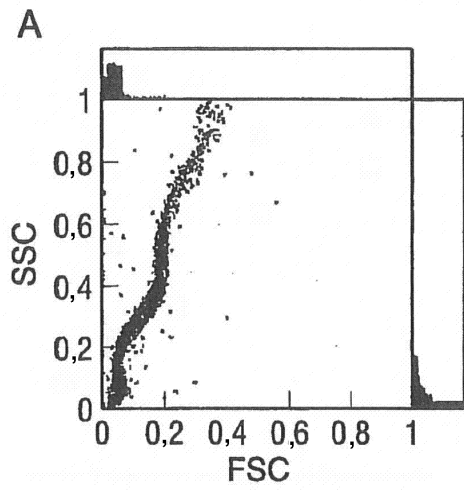


FIG. 3A

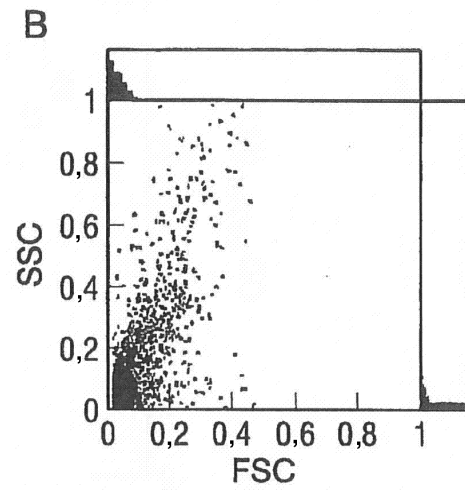


FIG. 3B

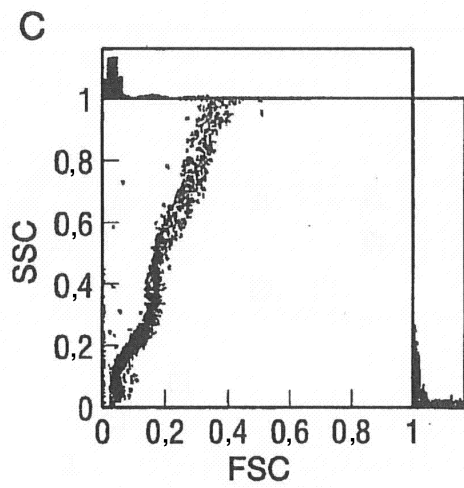


FIG. 3C

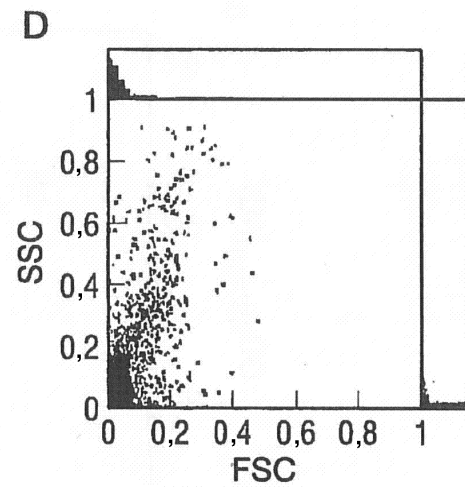
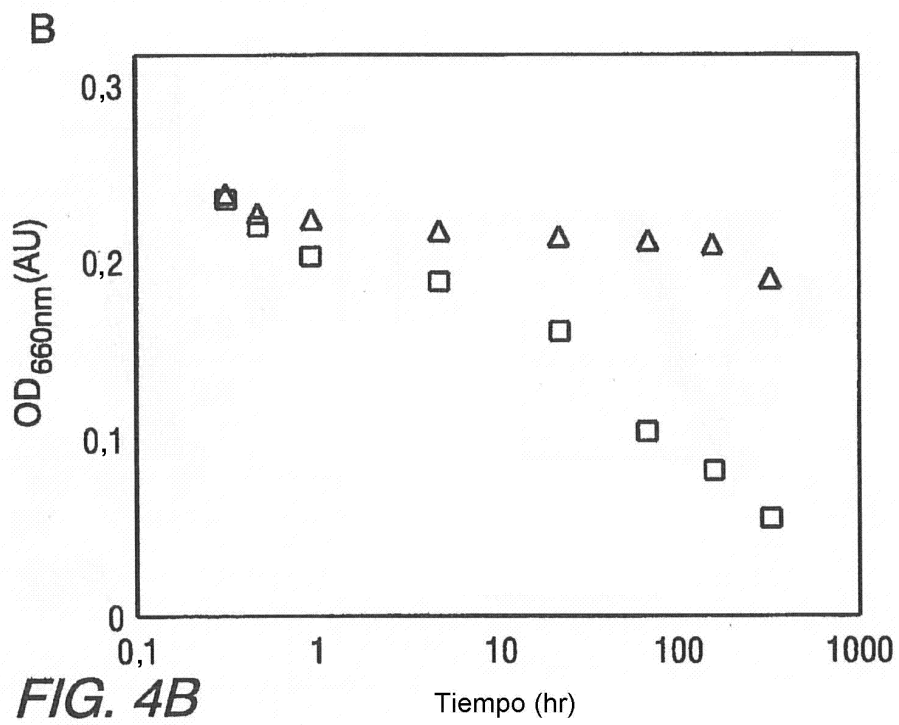
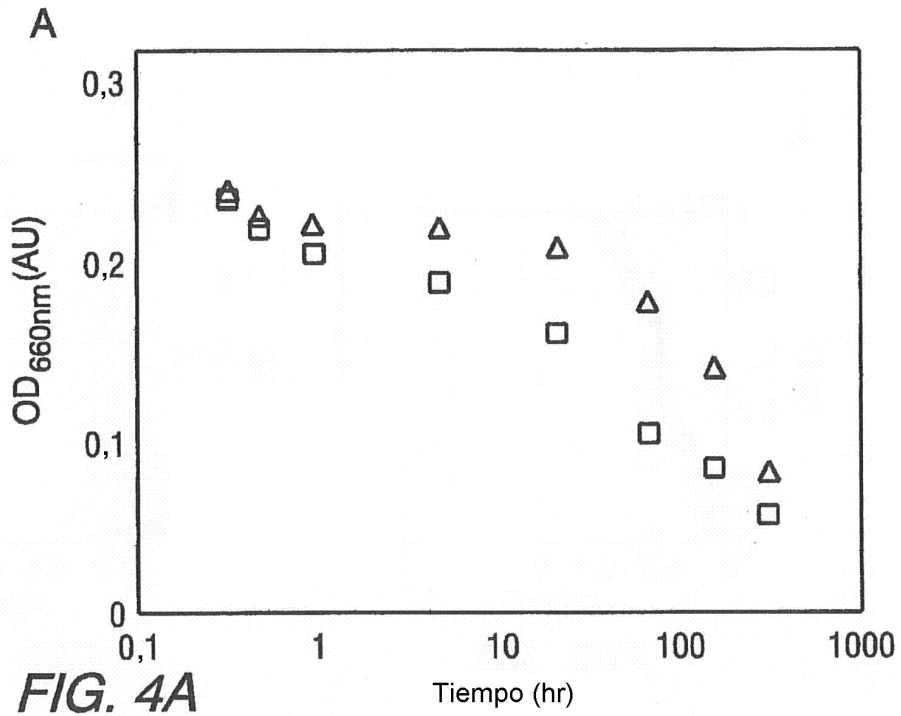
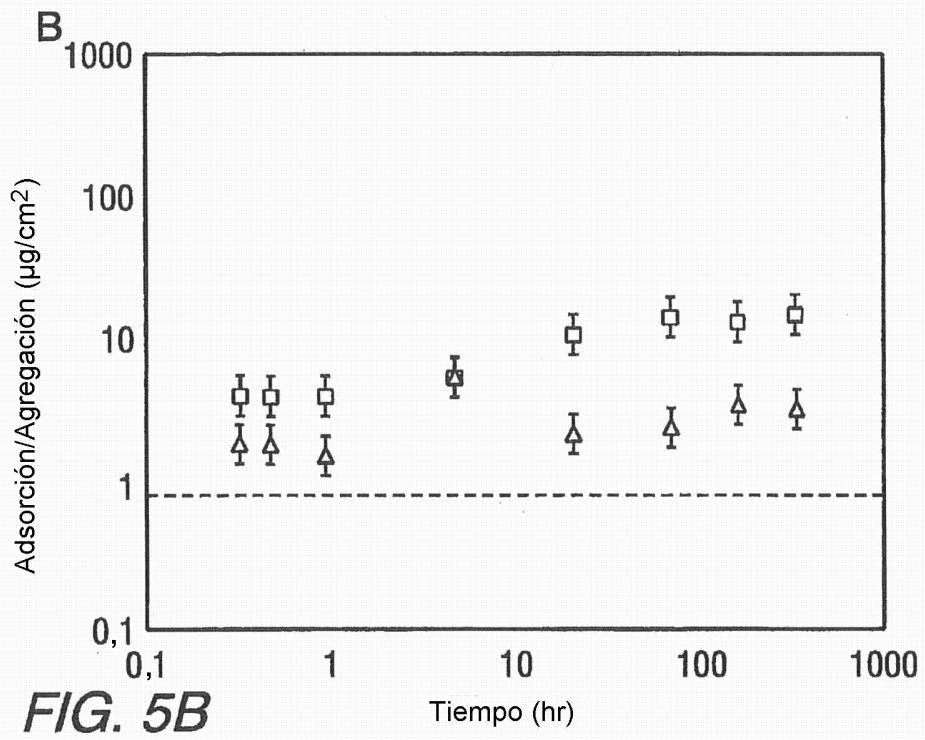
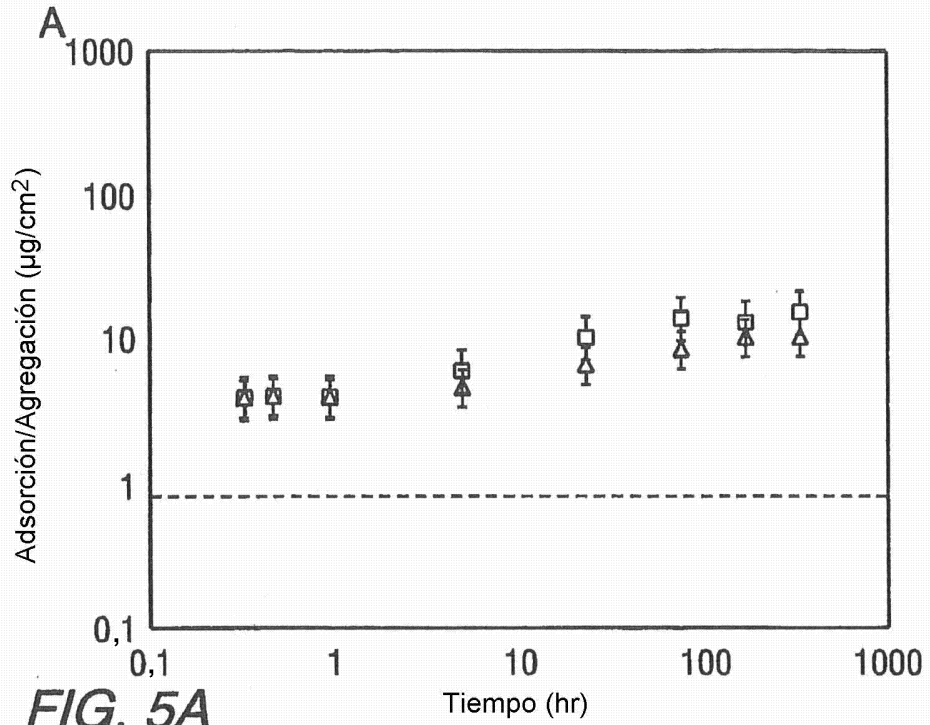


FIG. 3D





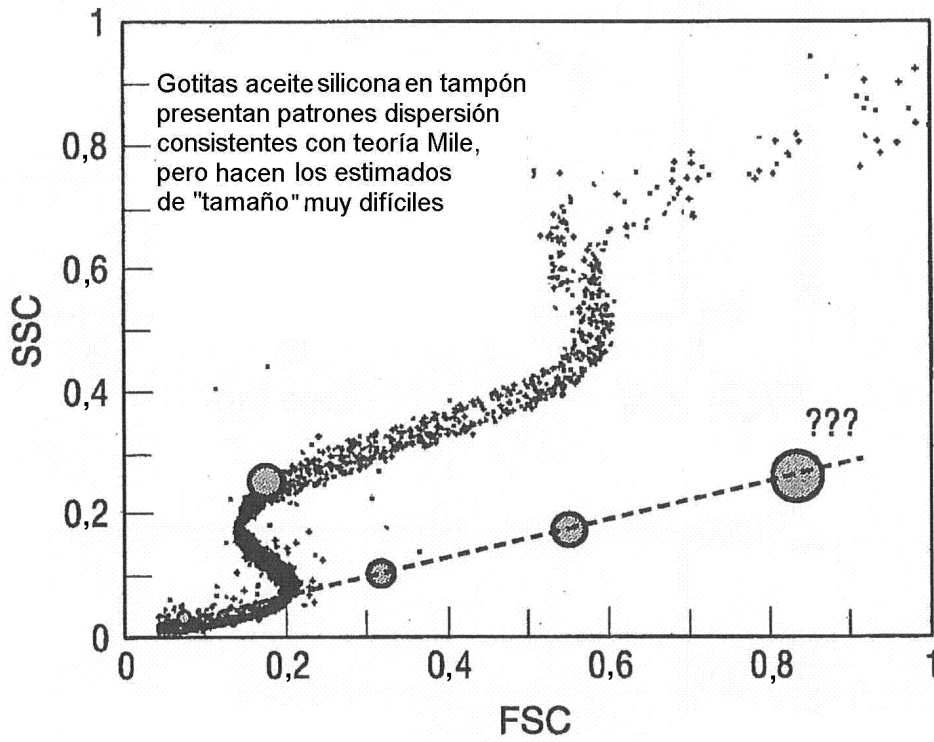


FIG. 6

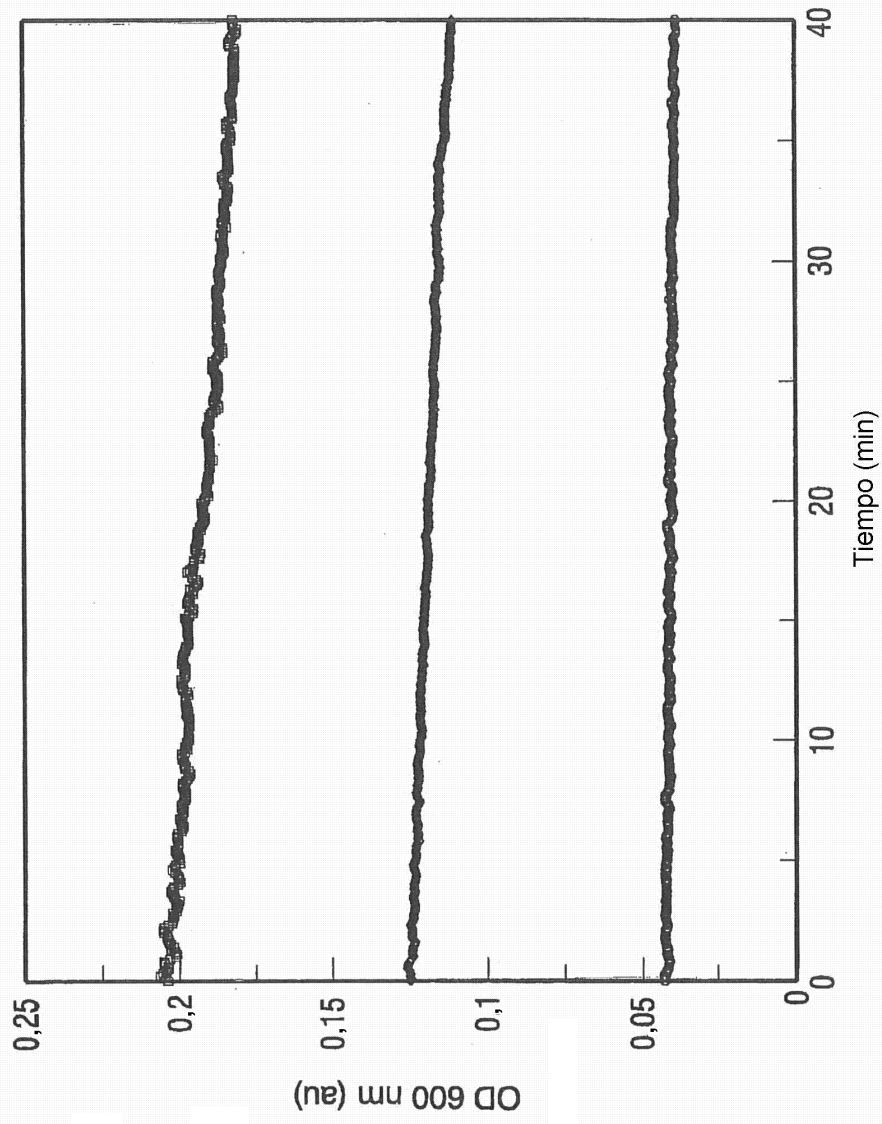


FIG. 7

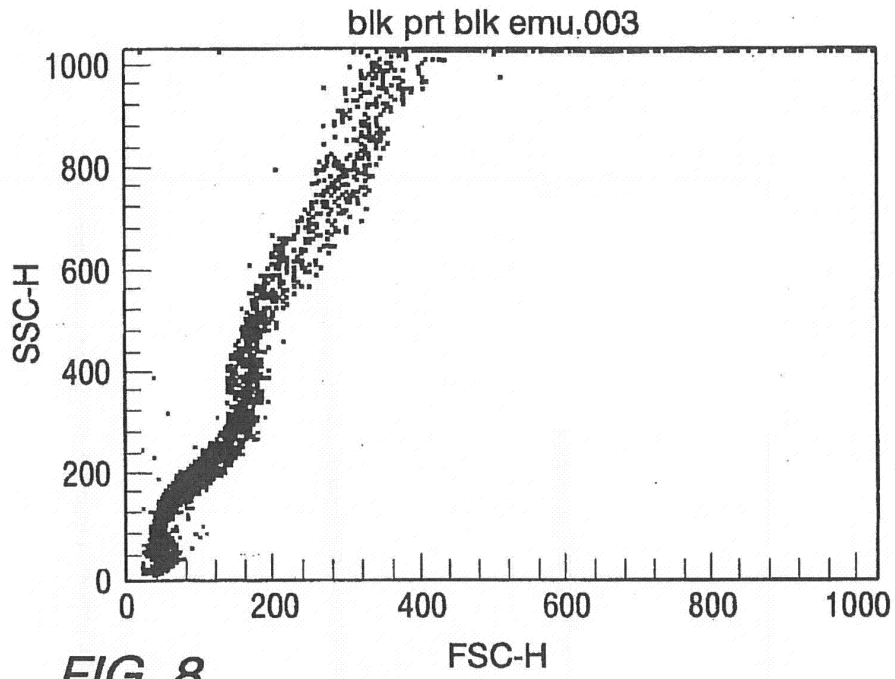


FIG. 8

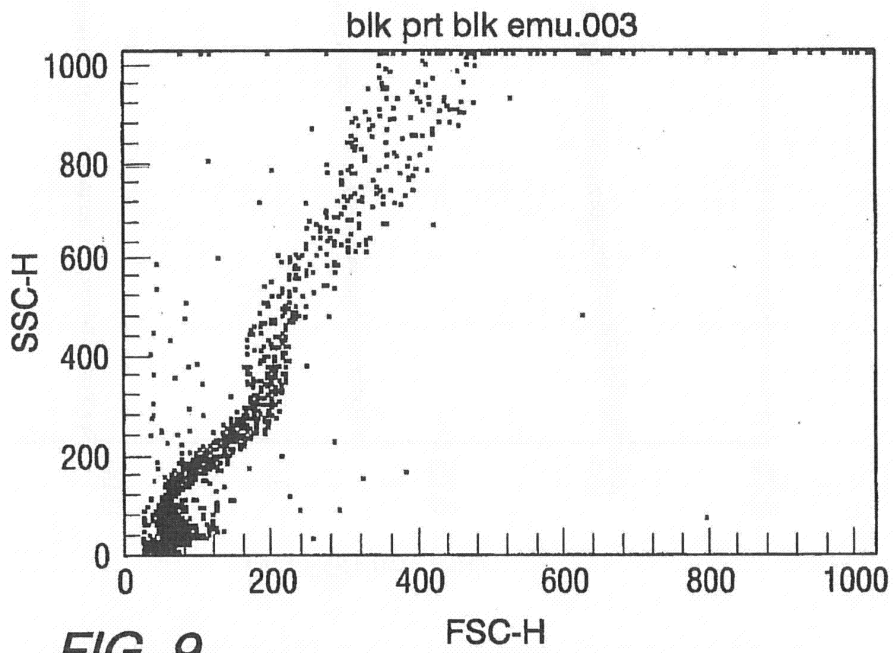


FIG. 9

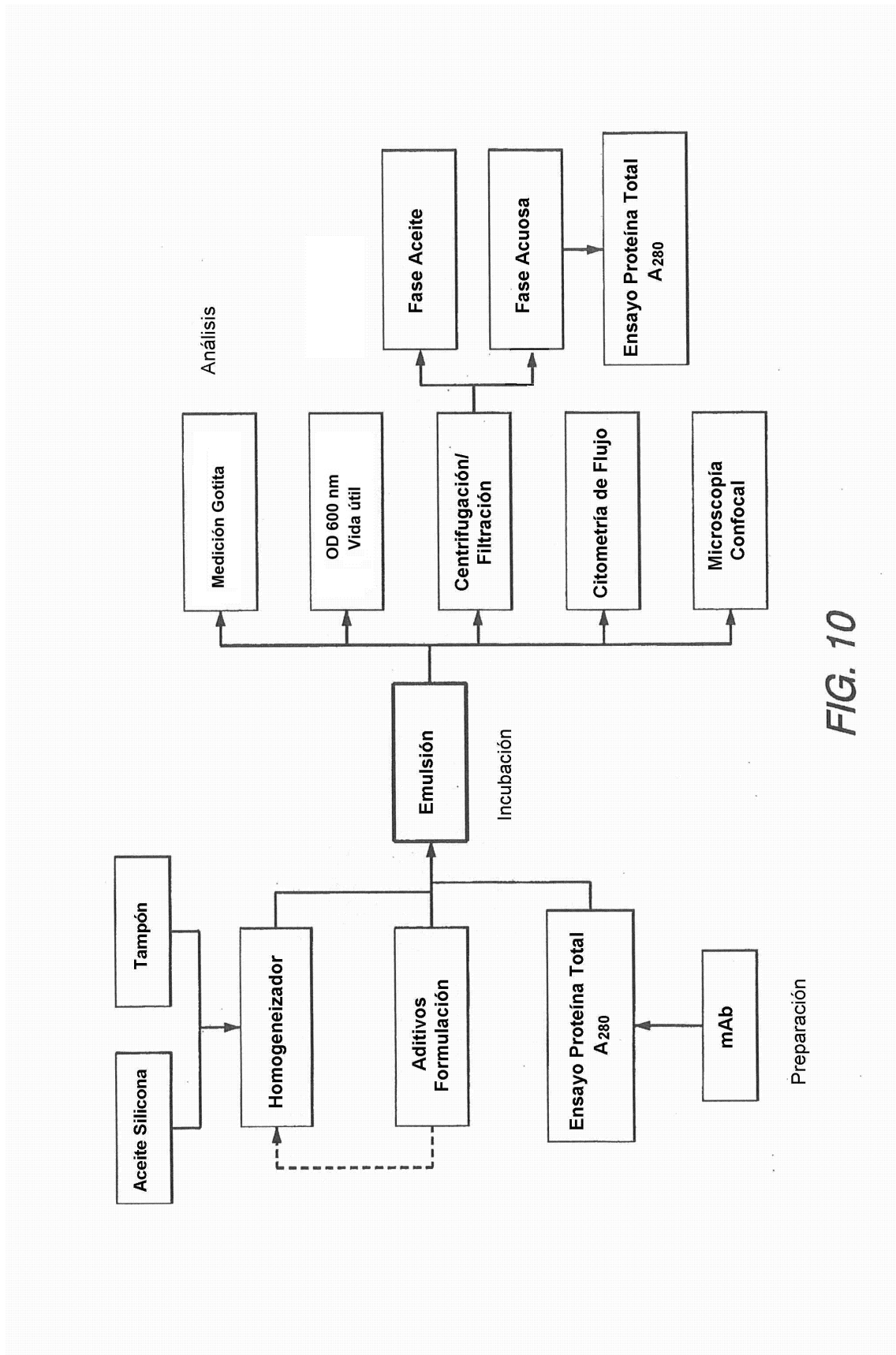


FIG. 10

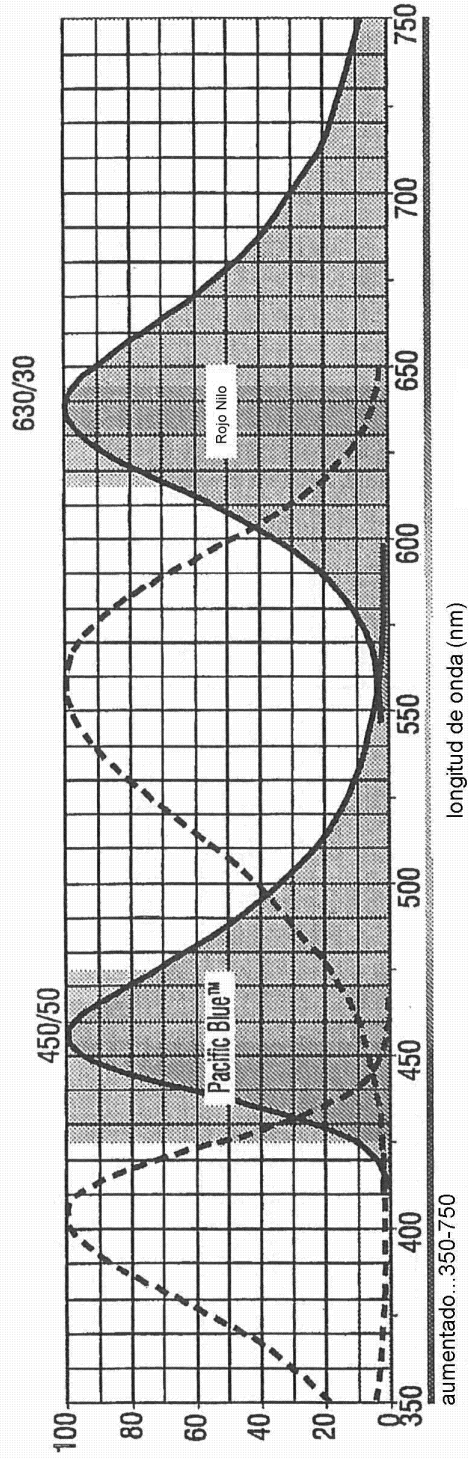


FIG. 11

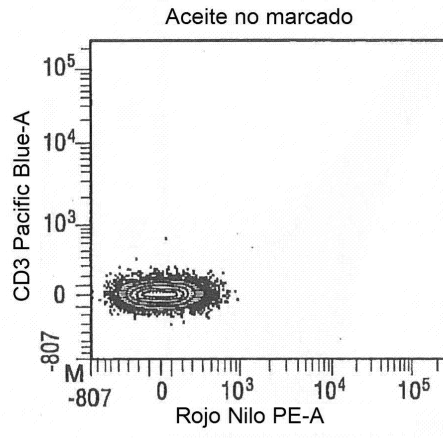


FIG. 12A

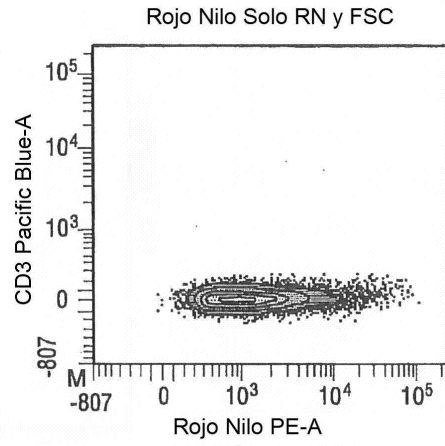


FIG. 12B

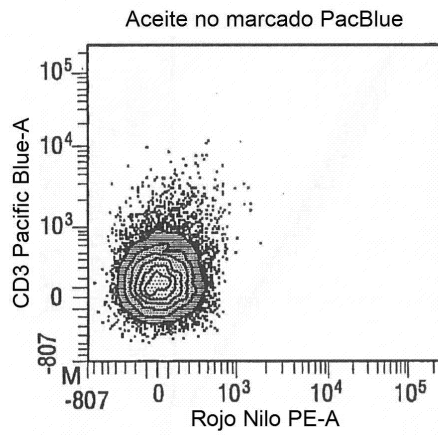


FIG. 12C

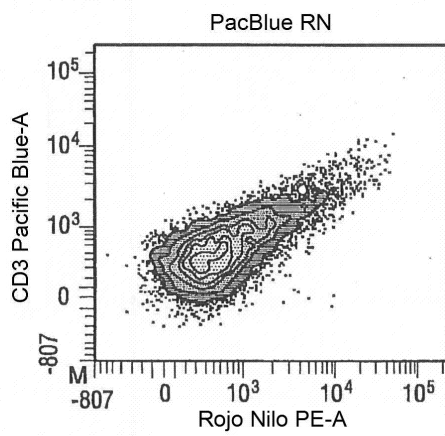


FIG. 12D

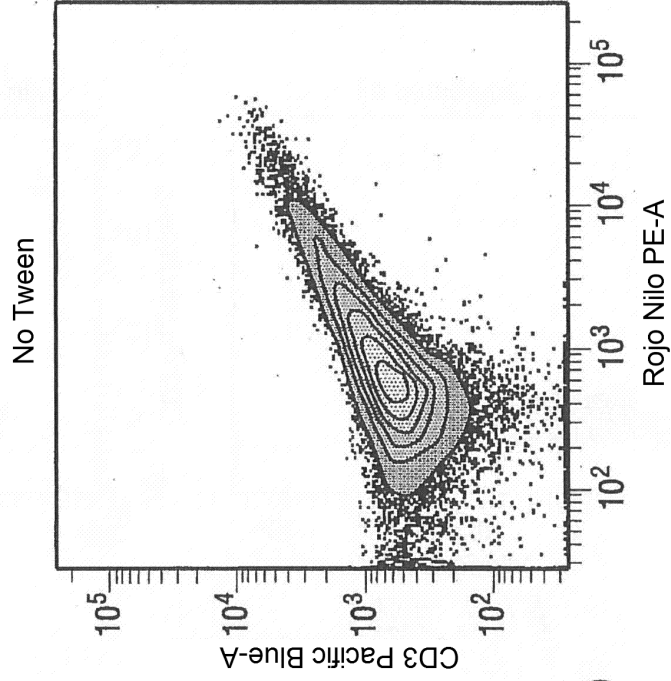


FIG. 13B

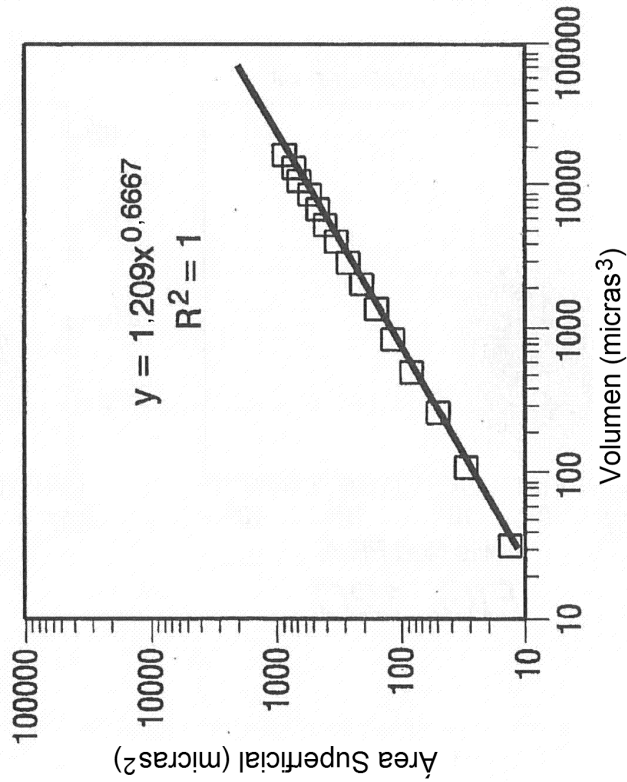


FIG. 13A

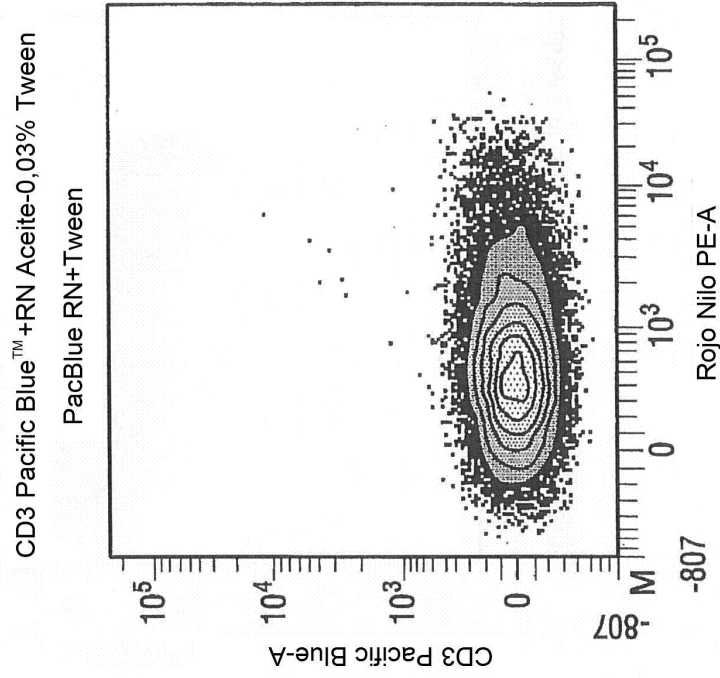


FIG. 14B

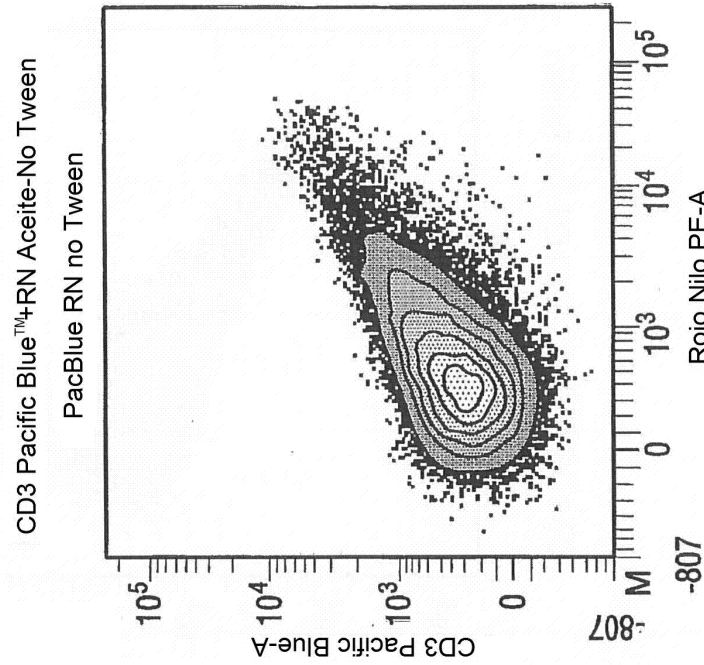


FIG. 14A

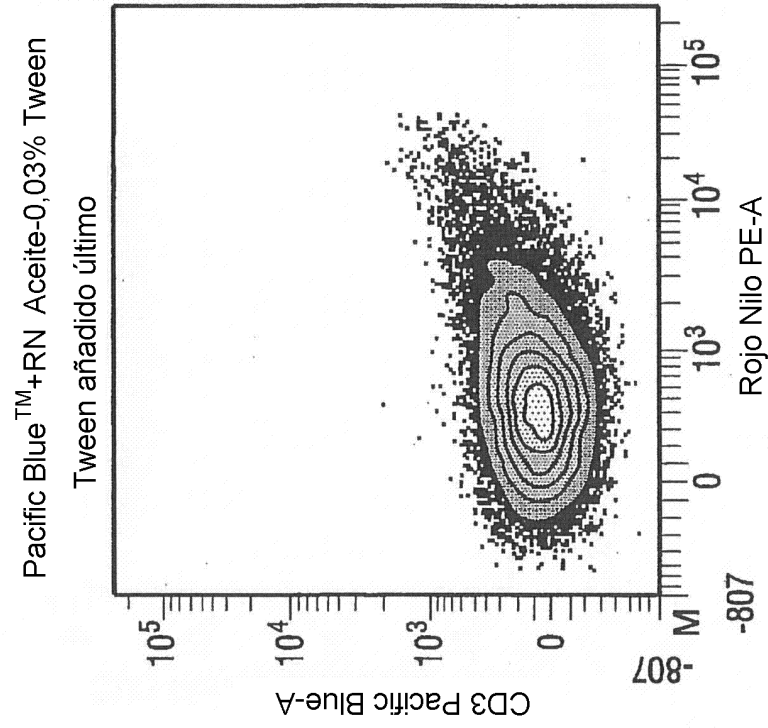


FIG. 15B

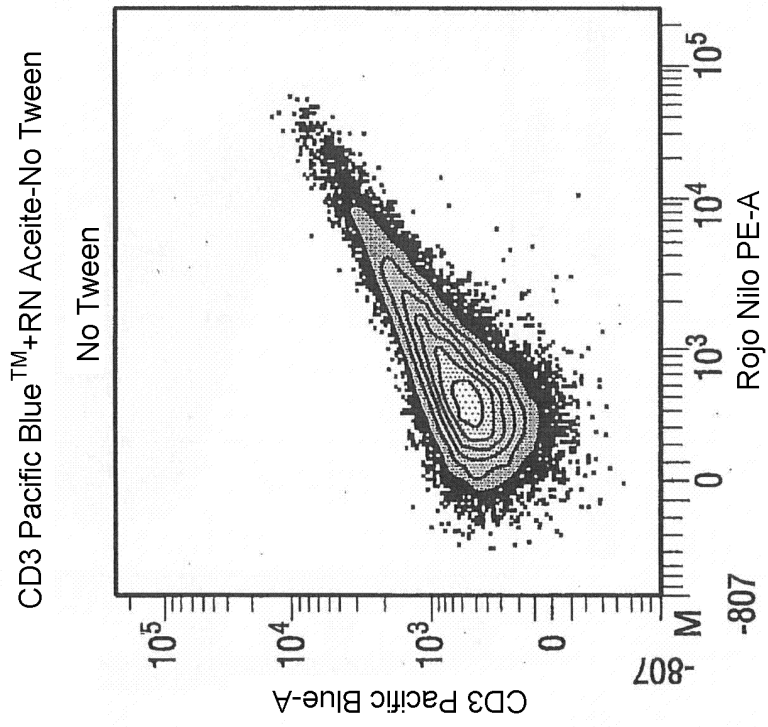


FIG. 15A

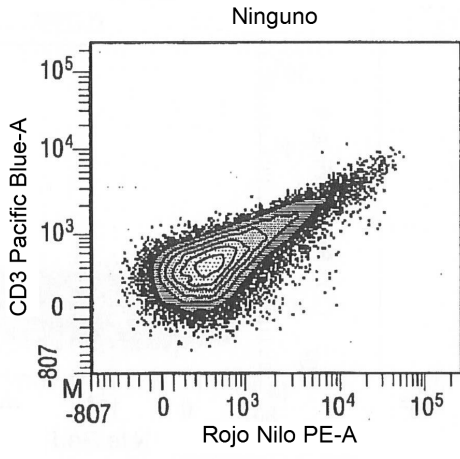


FIG. 16A

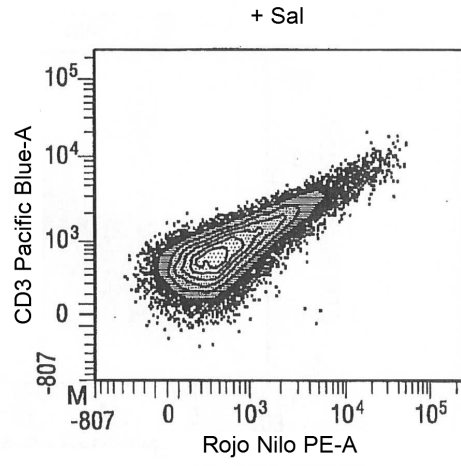


FIG. 16B

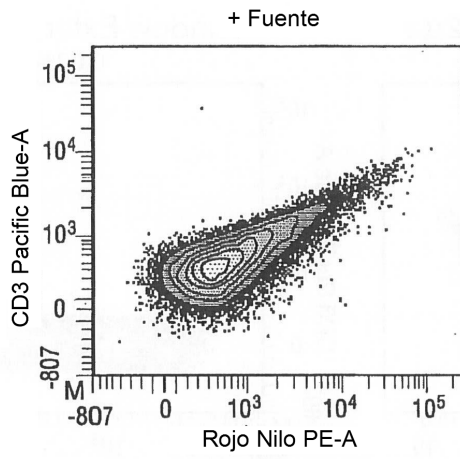


FIG. 16C

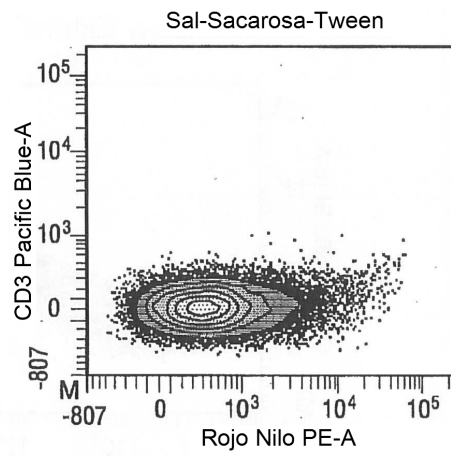


FIG. 16D

Extensión de Ventana 10 μ s
No

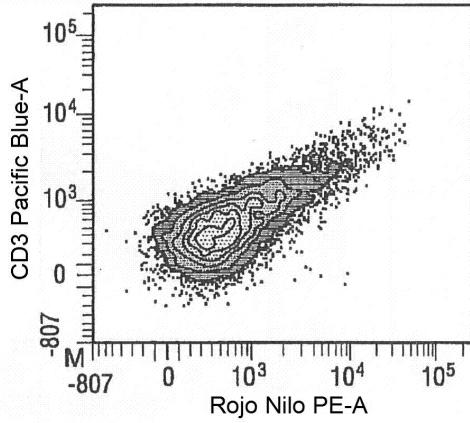


FIG. 17A

Extensión de Ventana 10 μ s
0,03%

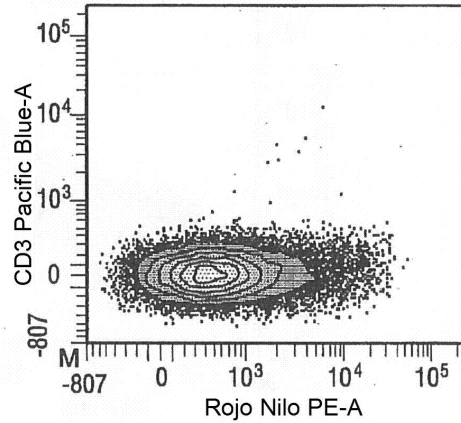


FIG. 17B

Extensión de Ventana 2 μ s
No

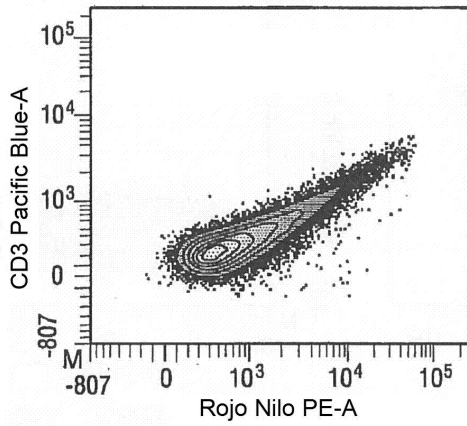


FIG. 17C

Extensión de Ventana 2 μ s
0,03%

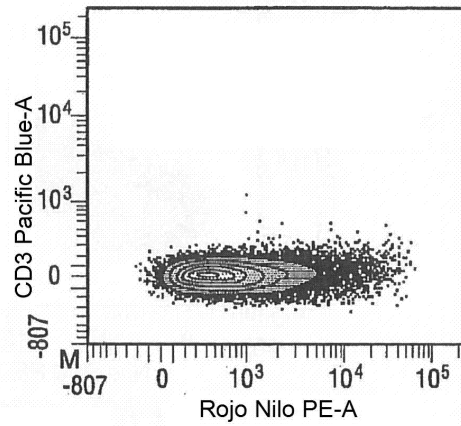


FIG. 17D