

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 897**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 47/26 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2012 PCT/GB2012/052477**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13050780**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2012 E 12772389 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2763525**

54 Título: **Estabilización de polipéptidos**

30 Prioridad:

05.10.2011 GB 201117233

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

25.09.2017

73 Titular/es:

**STABILITECH LTD. (100.0%)
Unit 6, Sovereign Business Park Albert Drive
Burgess HillWest Sussex RH15 9TY, GB**

72 Inventor/es:

**DREW, JEFFREY;
WOODWARD, DAVID THOMAS y
WARD, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 633 897 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

Estabilización de polipéptidos

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a la estabilización de polipéptidos.

10 **Antecedentes de la invención**

10 Algunas moléculas biológicas son suficientemente estables para poder aislarse, purificarse y después almacenarse en solución a temperatura ambiente. Sin embargo, esto no es posible para muchos materiales y se han probado técnicas que implican almacenamiento a temperatura baja, adición de estabilizadores o crioprotectores, liofilización, secado al vacío y secado al aire para asegurar la conservación en almacenamiento.

15 A pesar de la disponibilidad de estas técnicas, algunos materiales biológicos aún muestran niveles insatisfactorios de estabilidad durante el almacenamiento y algunas técnicas conducen a mayores costes e inconvenientes. Por ejemplo, el transporte y el almacenamiento refrigerados son caros, y cualquier interrupción en el control de temperatura puede dar como resultado reducción en la eficacia de la molécula biológica. Además, el transporte refrigerado con frecuencia no está disponible para el transporte de medicinas en países en desarrollo.

20 Además, las tensiones de liofilización o criosecado pueden ser muy perjudiciales para algunos materiales biológicos. La liofilización de productos biofarmacéuticos implica congelar soluciones o suspensiones de biomateriales termosensibles, seguido de secado primario y secundario. La técnica se basa en la sublimación del agua a temperatura subcero en vacío sin que se funda la solución. La liofilización representa una etapa clave para fabricar productos farmacéuticos de vacunas y proteínas sólidos. La velocidad de difusión del vapor de agua del biomaterial congelado es muy baja y por lo tanto el proceso consume mucho tiempo. Adicionalmente, las etapas tanto de congelación como de secado introducen tensiones que pueden desplegar o desnaturalizar las proteínas.

30 El documento WO 90/05182 describe un método para protegerlas contra la desnaturalización al secar. El método comprende las etapas de mezclar una solución acuosa de la proteína con un polielectrolito catiónico soluble y un poliol cíclico y retirar agua de la solución. El dietilaminoetilidextrano (DEAE-dextrano) y el quitosano son los polielectrolitos catiónicos preferidos, aunque también se menciona como adecuada la polietilenimina.

35 El documento WO-A-2006/0850082 presenta un producto desecado o conservado que comprende un azúcar, un material con carga tal como una proteína histona y un componente biológico sensible a desecación o temperatura. El azúcar forma una matriz sólida amorfa. Sin embargo, la histona puede tener consecuencias inmunológicas si el componente biológico conservado se administra a un ser humano o animal.

40 El documento WO 2008/114021 describe un método para conservar partículas víricas. El método comprende secar una solución acuosa de uno o más azúcares, una polietilenimina y las partículas víricas para formar una matriz sólida amorfa que comprende las partículas víricas. La solución acuosa contiene la polietilenimina a una concentración de 15 μM o menos basándose en la masa molar promedio en número (M_n) de la polietilenimina y la concentración de azúcar o, si está presente más de un azúcar, la concentración de azúcar total es mayor de 0,1 M.

45 El documento WO 2010/035001 describe un método para conservar polipéptidos. El método comprende secar una solución acuosa de uno o más azúcares, una polietilenimina y el polipéptido para formar una matriz sólida amorfa que comprende el polipéptido. La solución acuosa contiene la polietilenimina a una concentración de 25 μM o menos basándose en la masa molar promedio en número (M_n) de la polietilenimina y la concentración de azúcar o, si está presente más de un azúcar, la concentración de azúcar total es superior a 0,1 M.

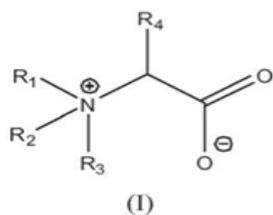
50 **Sumario de la invención**

55 Los presentes inventores han descubierto que las preparaciones de polipéptidos están conservadas de forma estable por compuestos de fórmula (I) y/o (II) como se define en el presente documento o sales o ésteres fisiológicamente aceptables de dos mismos y uno o más azúcares durante el secado. La actividad polipeptídica se conservó después de la exposición al calor posterior. También puede conservarse la actividad polipeptídica en la solución acuosa antes del secado.

60 En consecuencia, la presente invención proporciona un método para conservar un polipéptido que comprende:

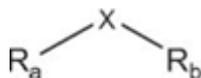
- (a) proporcionar una solución acuosa de (i) el polipéptido, (ii) uno o más azúcares en los que la concentración de azúcar, o la concentración de azúcar total, es de 0,05 M a 3 M y (iii) de 0,001 M a 2,5 M de un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo

65



en la que R_1 , representa hidrógeno o alquilo C_{1-4} , R_2 representa hidrógeno o alquilo C_{1-4} , R_3 representa alquilo C_{1-4} y R_4 representa hidrógeno; y/o

5 de 0,001 M a 2,5 M de un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo



10 en la que X representa $-S(O)_2-$ y R_a y R_b representan independientemente alquilo C_{1-4} ; y
(b) liofilizar la solución para formar una composición que incorpora el polipéptido.

15 La invención proporciona además:

- un método para preparar una vacuna que incorpora un inmunógeno de vacuna, comprendiendo dicho método: (a) proporcionar una solución acuosa de (i) un inmunógeno de vacuna, (ii) de 0,001 M a 2,5 M de un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o de 0,001 M a 2,5 M de un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y (iii) uno o más azúcares, en el que la concentración de azúcar, o la concentración de azúcar total, es de 0,05 M a 3 M; y (b) opcionalmente añadir un adyuvante, tampón, antibiótico y/o aditivo a la mezcla; y (c) liofilizar la solución para formar una composición o composición sólida que incorpora dicho inmunógeno de vacuna;
- una composición que puede obtenerse por los métodos de la invención en la que dicha composición es una matriz sólida, liofilizada que incorpora el polipéptido o el inmunógeno de vacuna; y
- uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo a una concentración de 0,001 M a 2,5 M y/o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo a una concentración de 0,001 M a 2,5 M y uno o más azúcares, en el que la concentración de azúcar, o la concentración de azúcar total, es de 0,05 M a 3 M, para conservar un polipéptido durante la liofilización.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los resultados de un estudio de exposición térmica inicial en $F(ab')_2$ a 56 °C durante 24 horas en el Ejemplo 1. TC indica exposición térmica. Los datos no están normalizados y las barras de error son desviación típica, $n=2$. Los resultados muestran que $F(ab')_2$ es extremadamente termolábil.

La Figura 2 muestra la actividad de $F(ab')_2$ residual (a 0,5 $\mu\text{g/ml}$) restante después de un exposición térmica de 9 meses a +40 °C en el Ejemplo 1. Las barras de error muestran el error típico, $n=4$.

La Figura 3 muestra los resultados de un estudio preliminar en el Ejemplo 2 usando la IgG de ratón no conjugada anti *Neisseria gonorrhoeae*, para determinar la estabilidad inicial del anticuerpo a una temperatura elevada. Los datos no están normalizados y las barras de error son la desviación típica, $n=2$. Se descubrió que el anticuerpo era extremadamente termolábil con poca actividad restante después de 7 días a +56 °C en un entorno líquido, y aproximadamente un tercio de pérdida de actividad en la situación liofilizada.

La Figura 4 muestra actividad de mAb conjugado con HRP residual (a 0,5 $\mu\text{g/ml}$) restante después de exposición térmica a +40 °C en el Ejemplo 2. Las barras de error muestran el error típico, $n=2$.

La Figura 5 muestra actividad del fragmento $F(ab')_2$ bivalente residual (a 0,5 $\mu\text{g/ml}$) restante después de una exposición térmica de 6 meses a +40 °C en el Ejemplo 3. Las barras de error son error típico, $n=2$.

La Figura 6 muestra seguimiento por HPLC-SEC de todas las condiciones antes y después de la liofilización en el Ejemplo 4. Leyenda: pre: muestra preliofilizada (líquido); post: muestra postliofilizada; hiD.Man: DMG 1,0 M + Manitol 0,55 M; mdD.Man: DMG 0,7 M + Manitol 0,55 M; lo.DMan: DMG 0,3 M + Manitol 0,55 M; xD.Man: [DMG 1,0 M o 0,7 M o 0,3 M] + Manitol 0,55 M; Man: Manitol 0,55 M y PBS: solución salina tamponada con fosfato (control).

La Figura 7 muestra las trazas de HPLC de las 5 condiciones después de dos meses de incubación a 40 °C en el Ejemplo 4. Leyenda: pre: muestra preliofilizada (líquido); post: muestra postliofilizada; hiD.Man: DMG 1,0 M + Manitol 0,55 M; mdD.Man: DMG 0,7 M + Manitol 0,55 M; lo.DMan: DMG 0,3 M + Manitol 0,55 M; xD.Man: [DMG 1,0 M o 0,7 M o 0,3 M] + Manitol 0,55 M; Man: Manitol 0,55 M y PBS: solución salina tamponada con fosfato (control).

La Figura 8 muestra el estudio de exposición térmica inicial en el Ejemplo 5. Los datos no están normalizados y

las barras de error son desviación típica, $n=2$.

La Figura 9 muestra actividad del fragmento Fab monovalente residual (a 0,5 $\mu\text{g/ml}$) restante después de una exposición térmica de 6 meses a +4 °C en el ejemplo 5. Las barras de error son error típico, $n=2$.

5 La Figura 10 muestra un sumario de las estadísticas del modelo usado para representar los datos en el Ejemplo 6. La "Actividad" representa un modelo de respuesta = % de actividad recuperada, "Torta" representa el modelo de respuesta = calidad de la torta. En general, un valor de 1 para cada medida implica perfección. R^2 = coeficiente de determinación - una medida de la bondad de ajuste. $R^2 < 0,5$ = baja significación de modelo. Q^2 = estimación de precisión de la predicción - una medida de la bondad de predicción. Q^2 debería ser $> 0,1$ para un modelo significativo. Q^2 debería ser $> 0,5$ para un buen modelo. $R^2 - Q^2$ debería ser $< 0,2$ a $0,3$. Validez del modelo = "un ensayo de diversos problemas del modelo". Validez del modelo $< 0,25$ = indicador de problemas modelo estadísticamente significativos, por ejemplo valores atípicos, modelo/transformación incorrectos. Reproducibilidad = medida de la variación entre repeticiones en comparación con variabilidad general. Reproducibilidad $> 0,5$ implica significación.

15 La Figura 11 muestra los términos conservados en el modelo después de ajuste en el Ejemplo 6. Las barras de error que no cruzan el origen indican un factor significativo en el I.C. al 90 %.

La Figura 12 muestra una representación de contorno 4D que muestra la actividad de G-CSF recuperada predicha con variación de la formulación en el Ejemplo 6. Las representaciones se centran alrededor del óptimo generado por Monte-Carlo. La cruz marca el óptimo predicho.

20 La Figura 13 muestra una representación de contorno 4D que muestra la calidad de torta predicha con variación de la formulación en el Ejemplo 6. Las representaciones se centran alrededor del óptimo generado por Monte-Carlo. La cruz marca el óptimo predicho.

La Figura 14 muestra una representación de contorno 4D que muestra la actividad de G-CSF recuperada predicha con variación de la formulación en el Ejemplo 6. Las representaciones se centran alrededor del óptimo generado por Monte-Carlo. La cruz marca el óptimo predicho.

25 La Figura 15 muestra una representación de contorno 4D que muestra la calidad de torta predicha con variación de la formulación en el Ejemplo 6. Las representaciones se centran alrededor del óptimo generado por Monte-Carlo. La cruz marca el óptimo predicho.

30 La Figura 16 muestra un sumario de la estadística del modelo usado para representar los datos del Ejemplo 7. La "Actividad" representa un modelo de respuesta = % de actividad recuperada, "Torta" representa el modelo de respuesta = calidad de la torta. En general, un valor de 1 para cada medida implica perfección. R^2 = coeficiente de determinación - una medida de la bondad de ajuste. $R^2 < 0,5$ = baja significación del modelo. Q^2 = estimación de la precisión de predicción - una medida de la bondad de predicción. Q^2 debería ser $> 0,1$ para un modelo significativo. Q^2 debería ser $> 0,5$ para un buen modelo. $R^2 - Q^2$ debería ser $< 0,2$ a $0,3$. Validez del modelo = "un ensayo de diversos problemas de modelo". Validez del modelo $< 0,25$ = indicador de problemas de modelo estadísticamente significativos, por ejemplo valores atípicos, modelo/transformación incorrectos. Reproducibilidad = medida de la variación entre repeticiones en comparación con variabilidad general. Reproducibilidad $> 0,5$ implica significación.

40 La Figura 17 muestra los términos conservados en el modelo después de ajuste en el Ejemplo 7. Las barras de error que no cruzan el origen indican un factor significativo en el I.C. al 90 %.

La Figura 18 muestra una representación de contorno 4D que muestra la actividad de G-CSF recuperada predicha con variación de la formulación en el Ejemplo 7. Las representaciones se centran alrededor del óptimo generado por Monte-Carlo. La cruz marca el óptimo predicho.

45 La Figura 19 muestra una representación de contorno 4D que muestra la calidad de torta predicha con variación de la formulación en el Ejemplo 7. Las representaciones se centran alrededor del óptimo generado por Monte-Carlo. La cruz marca el óptimo predicho

Las Figuras 20 a 25 muestran los resultados de calorimetría de exploración diferencial del Ejemplo 8.

La Figura 26 muestra la actividad del antígeno protector recombinante (rPA) para manitol 0,548 M y TMG 0,8 M en el Ejemplo 9.

50 La Figura 27 muestra la actividad del antígeno protector recombinante (rPA) para manitol 0,548 M en el Ejemplo 9.

La Figura 28 muestra la actividad del antígeno protector recombinante (rPA) para manitol 0,548 M y DMG 0,7 M en el Ejemplo 10.

La Figura 29 muestra la actividad del antígeno protector recombinante (rPA) para manitol 0,5 M y DMG 0,7 M en el Ejemplo 10.

55 La Figura 30 muestra la actividad del antígeno protector recombinante (rPA) para manitol 0,6 M, DMG 0,6 M y TMG 0,65 M en el Ejemplo 10.

La Figura 31 muestra la actividad del antígeno protector recombinante (rPA) para manitol 0,548 M, DMG 0,6 M y TMG 0,65 M en el Ejemplo 10.

60 La Figura 32 muestra la actividad del antígeno protector recombinante (rPA) para manitol 0,5 M, DMG 0,6 M y TMG 0,65 M en el Ejemplo 10.

La Figura 33 muestra la actividad del antígeno protector recombinante (rPA) para manitol 0,5 M en el Ejemplo 10.

La Figura 34 muestra la actividad del antígeno protector recombinante (rPA) para manitol 0,6 M en el Ejemplo 10.

Las Figuras 35 a 38 muestran los resultados de calorimetría de exploración diferencial del Ejemplo 11.

65 La Figura 39 muestra una imagen de MEB para muestra liofilizada 5 (DMG 0,5 M, manitol 0,5 M) preparada en el Ejemplo 11.

Descripción detallada de la invención

Sumario

5 La presente invención se refiere a la conservación de un polipéptido por un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y uno, dos o más azúcares. El polipéptido se pone en contacto con el compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y uno o más azúcares en una solución acuosa y la solución resultante en la que está presente el polipéptido se seca después para formar una composición que incorpora el polipéptido.

10 El polipéptido puede mezclarse por lo tanto con una solución acuosa ("mezcla de conservación") del compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y uno o más azúcares. La solución resultante se seca después para formar una composición que incorpora el polipéptido. La composición seca puede tomar la forma de una torta o un polvo. La torta puede molerse a un polvo si es necesario.

15 La invención permite que se conserve la estructura y función polipeptídica durante la etapa de secado. Puede mantenerse de este modo la actividad polipeptídica después del secado. La presencia de un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo por sí sola permite la conservación de la actividad polipeptídica. Pueden conseguirse mejoras adicionales de la conservación de la actividad polipeptídica mediante el uso de uno o más azúcares en combinación con un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo.

20 El polipéptido conservado demuestra resistencia térmica mejorada que permite la extensión del periodo de validez, la facilidad de almacenamiento y el transporte y evitar la necesidad de una cadena de frío para su distribución. La invención puede proporcionar por lo tanto protección como un crioprotector (protección contra daño por congelación), lioprotector (protección durante la liofilización) y/o un termoprotector (protección contra temperaturas mayores o menores de 4 °C).

25 Además, el polipéptido se conserva en la solución acuosa antes de la etapa de secado. Esto permite que la solución acuosa se almacene después de la preparación, hasta el momento en que pueda llevarse a cabo la etapa de secado, sin pérdida indebida de la actividad polipeptídica.

Polipéptidos

30 Cualquier polipéptido tal como un polipéptido fisiológicamente activo es adecuado para su uso en la invención. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un péptido pequeño de menos de 15 aminoácidos tal como de 6 a 14 aminoácidos (por ejemplo, oxitocina, ciclosporina), un péptido mayor de entre 15 y 50 aminoácidos (por ejemplo, calcitonina, hormona liberadora de hormona del crecimiento 1-29 (GHRH)), una proteína pequeña de entre 50 y 250 aminoácidos de longitud (por ejemplo, insulina, hormona del crecimiento humana), una proteína mayor de 250 aminoácidos de longitud o una proteína multisubunitaria que comprende un complejo de dos o más cadenas polipeptídicas.

35 Típicamente, el polipéptido es una hormona, un factor de crecimiento, un péptido o una citocina; un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o ligando del mismo; una oxidorreductasa, una transferasa, una hidrolasa, una liasa, una isomerasa o una ligasa; o un inmunógeno de vacuna.

40 El polipéptido puede ser una hormona peptídica, un factor de crecimiento o una citocina. Puede ser un polipéptido de unión al antígeno, un inhibidor del receptor, mimético del ligando o agente de bloqueo del receptor. Típicamente, el polipéptido está en una forma sustancialmente pura. Puede ser por lo tanto un polipéptido aislado. Por ejemplo, el polipéptido puede aislarse después de la producción recombinante.

45 Por ejemplo, el polipéptido puede ser una hormona seleccionada de una hormona del crecimiento (GH), prolactina (PRL), un lactógeno placentario humano (hPL), una gonadotropina (por ejemplo, hormona luteinizante, hormona foliculoestimulante), una hormona estimulante del tiroides (TSH), un miembro de la familia de pro-opiomelanocortina (POMC), vasopresina y oxitocina, una hormona natriurética, hormona paratiroidea (PTH), calcitonina, insulina, un glucagón, somatostatina y una hormona gastrointestinal.

50 El polipéptido puede ser un péptido de Taquiquinina (por ejemplo, Sustancia P, Kasinina, Neuroquinina A, Eledoisina, Neuroquinina B), un péptido intestinal vasoactivo (por ejemplo, VIP (Péptido Intestinal Vasoactivo; PHM27), PACAP (Péptido Activador de Adenilato Ciclasa de la Hipófisis), péptido PHI 27 (Péptido Histidina Isoleucina 27), GHRH 1-24 (Hormona Liberadora de Hormona del crecimiento 1-24), Glucagón, Secretina), un péptido relacionado con polipéptido pancreático (por ejemplo NPY, PYY (Péptido YY), APP (Polipéptido Pancreático Aviar), PPY (polipéptido pancreático), un péptido opioide (por ejemplo, péptidos de Proopiomelanocortina (POMC),

pentapéptidos de Encefalina, péptido de Prodinorfina, un péptido de calcitonina (por ejemplo, calcitonina, amilina, AGG01) u otro péptido (por ejemplo, péptido natriurético de tipo B (BNP)).

5 El polipéptido puede ser un factor de crecimiento seleccionado de un miembro de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), familia de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), familia de factores de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento transformante α (TGF- α), Eritropoyetina (Epo), Factor de Crecimiento de Tipo Insulina-I (IGF-I), Factor de Crecimiento de Tipo Insulina-II (IGF-II). Típicamente, el factor de crecimiento es un factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), un factor de crecimiento nervioso (NGF), una neurotrofina, un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), Eritropoyetina (EPO), Trombopoyetina (TPO), Miostatina (GDF-8), un Factor de Diferenciación de Crecimiento 9 (GDF-9), Factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF o FGF-1), Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico (bFGF o FGF-2), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) o un Factor de crecimiento de Hepatocitos (HGF).

15 El polipéptido puede ser una citocina seleccionada de Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-6 (IL-6) Interleucina-8 (IL-8), Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), Factor de Necrosis Tumoral- β (TNF- β), interferón- γ (INF- γ) y un Factor Estimulante de Colonias (CSF). Típicamente la citocina es un Factor Estimulante de Colonias de granulocitos (G-CSF) o un Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF).

20 El polipéptido puede ser un factor de coagulación de la sangre tal como Factor VIII, Factor V, Factor de von Willebrand o Factor de Coagulación III.

Típicamente, el polipéptido no es (a) luciferasa, un análogo de luciferasa que muestra actividad de tipo luciferasa o apirasa, y/o (b) Factor VIIa,

25

Anticuerpos

Un anticuerpo para uso en la invención puede ser un anticuerpo completo o un fragmento de unión a antígeno o ligando del mismo.

30

Anticuerpos completos

35 En una realización, el anticuerpo es un monómero, dímero, tetrámero, pentámero u otro oligómero de inmunoglobulina (Ig). Cada monómero de anticuerpo puede comprender cuatro cadenas polipeptídicas (por ejemplo, un anticuerpo convencional que consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas). Como alternativa, cada monómero de anticuerpo consiste en dos cadenas polipeptídicas (por ejemplo, un anticuerpo de cadena pesada que consiste en dos cadenas pesadas idénticas).

40 El anticuerpo puede ser cualquier clase o isotipo de anticuerpo (por ejemplo IgG, IgM, IgA, IgD o IgE) o cualquier subclase de anticuerpo (por ejemplo las subclases de IgG IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o subclases de IgA IgA1 o IgA2). Típicamente, el anticuerpo es un IgG tal como un anticuerpo IgG1, IgG2 o IgG4. Habitualmente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 o IgG2.

45 Típicamente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es de origen mamífero. El anticuerpo puede ser por lo tanto un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de primate, humano, roedor (por ejemplo, ratón o rata), conejo, ovino, porcino, equino o camélido. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser originario de tiburón o pollo.

50 El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. Se obtienen anticuerpos monoclonales de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos que se dirigen contra un único determinante del antígeno. Una población de anticuerpos policlonales comprende una mezcla de anticuerpos dirigidos contra diferentes epítomos.

Fragmentos de unión a antígeno o ligando

55 El fragmento de unión a antígeno puede ser cualquier fragmento de un anticuerpo que conserve capacidad de unión a antígeno o ligando, por ejemplo un Fab, F(Ab')₂, Fv, Fv con enlaces disulfuro, Fv monocatenario (scFv), scFv con enlace disulfuro, diacuerpo, anticuerpo lineal, anticuerpo de dominio o anticuerpo multiespecífico. Dichos fragmentos comprenden uno o más sitios de unión a antígeno o ligando. En una realización, el fragmento de unión a antígeno o ligando comprende cuatro regiones marco conservadas (por ejemplo FR1, FR2, FR3 y FR4) y tres regiones determinantes de complementariedad (por ejemplo, CDR1, CDR2 y CDR3). Se conocen bien en la técnica métodos adecuados para detectar la capacidad de un fragmento para unirse con un antígeno o ligando, por ejemplo inmunoensayos y presentación de fagos.

65 El anticuerpo o fragmento de unión puede ser un anticuerpo mono-específico, biespecífico o multiespecífico. Un anticuerpo multiespecífico tiene especificidad de unión por al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o más epítomos diferentes, antígenos o ligandos. Un anticuerpo biespecífico es capaz de unirse con dos

epítomos, antígenos o ligandos diferentes. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico puede comprender dos pares de V_H y V_L , uniéndose cada par de V_H/V_L con un único antígeno o epítomo. Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos, por ejemplo que implican la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, fusión de dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas para secuencias de dominio constante de inmunoglobulina o enlace químico de fragmentos de anticuerpo.

El anticuerpo biespecífico "diacuerpo" comprende un dominio variable de cadena pesada conectado con un dominio variable de cadena ligera en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Pueden generarse diacuerpos usando un enlazador (por ejemplo un enlazador peptídico) que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, de modo que se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear una molécula dimérica con dos sitios de unión a antígeno o ligando.

Un fragmento de anticuerpo scFv adecuado puede comprender V_H y V_L de un anticuerpo en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En general, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L , que permite que el scFv forme la estructura deseada para unión a antígeno.

Un anticuerpo de dominio para uso en los métodos de la invención puede consistir esencialmente en un dominio variable de cadena ligera (por ejemplo un V_L) o de un dominio variable de cadena pesada (por ejemplo un V_H). El dominio variable de cadena pesada puede derivar de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o de un anticuerpo de cadena pesada (por ejemplo un V_{HH} de camélido).

Modificaciones

El anticuerpo completo o fragmento del mismo puede asociarse con otros restos, tales como enlazadores, que pueden usarse para unir dos o más fragmentos o anticuerpos entre sí. Dichos enlazadores pueden ser enlazadores químicos o pueden estar presentes en forma de una proteína de fusión con un fragmento o anticuerpo completo. Los enlazadores pueden por lo tanto usarse para unir entre sí anticuerpos completos o fragmentos, que tienen las mismas especificidades de unión o especificidades de unión diferentes.

En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o ligando se une con un resto adicional tal como una toxina, un fármaco terapéutico (por ejemplo fármaco quimioterapéutico), radioisótopo, liposoma o enzima activadora de profármaco. El tipo de resto adicional dependerá del uso final del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o ligando puede unirse con una o más toxinas de moléculas pequeñas (por ejemplo calicheamicina, maitansina, tricoteno y CC1065) o una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma (por ejemplo, toxina de la difteria, cadena A de exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, curcina, crotina, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina o tricotecenos).

Los radioisótopos adecuados para unirse con el anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno incluyen, pero sin limitación, Tc^{99} , At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} y P^{32} .

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o ligando puede unirse, por ejemplo, con una enzima activadora de profármaco que convierte o es capaz de convertir un profármaco en un fármaco anti-neoplásico activo. Por ejemplo, puede usarse fosfatasa alcalina para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres, puede usarse arilsulfatasa para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres, puede usarse citosina desaminasa para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anti-neoplásico 5-fluoruracilo; y proteasas tales como proteasa de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres. La enzima puede ser una nitrorreductasa que se ha identificado como útil en el metabolismo de varios profármacos en terapia génica antineoplásica. Como alternativa, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno o ligando con actividad enzimática pueden usarse para convertir fragmentos en fármacos activos libres.

Un agente quimioterapéutico adecuado puede incluir, pero sin limitación, un agente alquilante tal como tiotepa y ciclofosfamida; un alquil sulfonato tal como busulfán, improsulfán y piposulfán; una aziridina tal como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; una mostaza del nitrógeno tal como clorambucilo, clornafazina, ifosfamida, melfalán; una nitrosourea tal como carmustina y fotemustina; un antimetabolito tal como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); un análogo de ácido fólico tal como denopterina y pteropterina; un análogo de purina tal como fludarabina y tiamiprina; un análogo de pirimidina tal como ancitabina, azacitidina, carmofur y doxifludina; un taxoide tal como paclitaxel y doxetaxel; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede estar PEGilado. Por lo tanto, una o más moléculas de polietilenglicol pueden unirse covalentemente con la molécula de anticuerpo o molécula de fragmento de anticuerpo. Pueden unirse covalentemente de una a tres moléculas de polietilenglicol a cada molécula de

anticuerpo o molécula de fragmento de anticuerpo. Dicha PEGilación se usa predominantemente para reducir la inmunogenicidad de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y/o aumentar la semi-vida en circulación del anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

5 *Anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos*

En una realización el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o ligando es un anticuerpo quimérico o fragmento del mismo que comprende secuencia de anticuerpos naturales diferentes. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo quimérico puede comprender una parte de la cadena pesada y/o ligera idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos de una especie o clase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos de otras especies o clases de anticuerpo. Típicamente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo quimérico comprende una quimera de componentes de anticuerpos de ratón y humanos.

15 Son formas humanizadas de anticuerpos no humanos anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado adecuado puede comprender, por ejemplo, inmunoglobulina en la que se reemplazan restos de una región hipervariable (por ejemplo, derivada de una CDR) del anticuerpo receptor o fragmento de unión a antígeno o ligando por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, algunos restos de región marco conservada de la inmunoglobulina humana pueden reemplazarse por restos no humanos correspondientes.

Como alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos o fragmentos de unión a antígeno. Por ejemplo, pueden producirse animales transgénicos (por ejemplo ratones) que sean capaces, tras su inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, la supresión homocigótica del gen de región de unión de cadena pesada de anticuerpo (J_H) en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal puede dar como resultado inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. Pueden transferirse genes de inmunoglobulina de línea germinal humana a dichos ratones mutantes de línea germinal para dar como resultado la producción de anticuerpos tras exposición al antígeno. Un anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno también puede generarse *in vitro* usando la técnica de presentación en fagos.

Dianas

35 Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o ligando capaz de unirse con cualquier antígeno diana es adecuado para su uso en los métodos de la presente invención. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser capaz de unirse con un antígeno o ligando asociado con un trastorno autoinmunitario (por ejemplo diabetes de Tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn y miastenia grave), un antígeno o ligando asociado con un cáncer o un estado inflamatorio, un antígeno asociado con osteoporosis, un antígeno asociado con enfermedad de Alzheimer, o un antígeno bacteriano o vírico.

En particular, la diana con la que se puede unir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o ligando puede ser un antígeno CD, factor de crecimiento, receptor del factor de crecimiento, receptor de superficie celular tal como un receptor de apoptosis, una proteína quinasa o una oncoproteína. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo monoclonal IgG1, IgG2 o IgG4 quimérico, humanizado o humano, puede ser capaz por lo tanto de unirse con factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), glucoproteína IIb/IIIa, CD33, CD52, CD20, CD11a, CD3, proteína F de VSR, receptor HER2/neu (erbB2), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), anti-TRAILR2 (anti-receptor de ligando inductor de apoptosis relacionado con factor de necrosis tumoral 2), proteína del sistema de complemento C5, integrina $\alpha 4$ o IgE.

Más específicamente, en el contexto de anticuerpos monoclonales antineoplásicos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse con una molécula de adhesión a células epiteliales (EpCAM), mucina-1 (MUC1/Can-Ag), EGFR, CD20, antígeno carcinoembrionario (CEA), HER2, CD22, CD33, Lewis Y y antígeno de membrana específico de próstata (PMSA). De nuevo, el anticuerpo es típicamente un anticuerpo monoclonal IgG1, IgG2 o IgG4 quimérico, humanizado o humano.

Los anticuerpos monoclonales adecuados incluyen, pero sin limitación: infliximab (anticuerpo quimérico, anti-TNF α), adalimumab (anticuerpo humano, anti-TNF α), basiliximab (anticuerpo quimérico, anti-IL-2), abciximab (anticuerpo quimérico, anti-GpIIb/IIIa), daclizumab (anticuerpo humanizado, anti-IL-2), gemtuzumab (anticuerpo humanizado, anti-CD33), alemtuzumab (anticuerpo humanizado, anti-CD52), edrecolomab (Ig2a murino, anti-EpCAM), rituximab (anticuerpo quimérico, anti-CD20), palivizumab (anticuerpo humanizado, diana de VSR), trastuzumab (anticuerpo humanizado, anti-receptor HER2/neu(erbB2)), bevacizumab (anticuerpo humanizado, anti-VEGF), cetuximab (anticuerpo quimérico, anti-EGFR), eculizumab (anticuerpo humanizado, anti-proteína de sistema del complemento C5), efalizumab (anticuerpo humanizado, anti-CD11a), ibritumomab (anticuerpo murino, anti-CD20), muromonab-CD3 (anticuerpo murino, anti-receptor de CD3 de linfocitos T), natalizumab (anticuerpo humanizado, anti-integrina

$\alpha 4$), nimotuzumab (IgG1 humanizado, anti-receptor de EGF), omalizumab (anticuerpo humanizado, anti-IgE), panitumumab (anticuerpo humano, anti-EGFR), ranibizumab (anticuerpo humanizado, anti-VEGF), ranibizumab (anticuerpo humanizado, anti-VEGF) y tositumomab I-131 (anticuerpo humanizado, anti-CD20).

5 Preparación de anticuerpos

Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales adecuados por ejemplo, mediante el método de hibridoma (por ejemplo como se describió por primera vez en Kohler *et al* Nature 256: 495 (1975)), por métodos de ADN recombinante y/o después del aislamiento de bibliotecas de fagos u otros anticuerpos.

10 La técnica de hibridoma implica inmunización de un animal hospedador (por ejemplo ratón, rata o mono) con un inmunógeno deseado para inducir linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente con el inmunógeno. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después se fusionan los linfocitos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma.

15 Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo también puede aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos como una alternativa a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para aislamiento de anticuerpos monoclonales. En particular, puede usarse presentación en fagos para identificar fragmentos de unión a antígeno o ligando para su uso en los métodos de la invención. Usando presentación en fagos para la exploración de alto rendimiento de interacciones de unión de antígeno-anticuerpo o ligando-anticuerpo, pueden aislarse fragmentos de anticuerpo presentados en proteínas de cubierta de fagos de una biblioteca de presentación en fagos. Inmovilizando un antígeno o ligando diana en un soporte sólido, un fago que presente un anticuerpo capaz de unirse con ese antígeno o ligando permanecerá en el soporte mientras que otros pueden retirarse por lavado. Los fagos que permanecen unidos pueden después eluirse y aislarse, por ejemplo después de ciclos repetidos de selección o clasificación. Pueden usarse fagos eluidos en la selección final para infectar un hospedador bacteriano adecuado del que pueden recogerse fagémidos y la secuencia de ADN relevante escindirse y secuenciarse para identificar el fragmento de unión a antígeno o ligando relevante.

20 Se aísla antisuero policlonal que contiene los anticuerpos deseados de animales usando técnicas bien conocidas en este campo. Pueden usarse por ejemplo animales tales como ovejas, conejos o cabras, para la generación de anticuerpos contra un antígeno de interés por la inyección de este antígeno (inmunógeno) en el animal, en ocasiones después de múltiples inyecciones. Después de recogida del antisuero, pueden purificarse anticuerpos usando técnicas de purificación inmunoabsorbentes u otras conocidas en este campo.

35 El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o ligando usado en el método de la invención puede producirse de forma recombinante a partir de secuencias de nucleótidos de origen natural o secuencias sintéticas. Dichas secuencias pueden aislarse por ejemplo por PCR a partir de un molde de origen natural adecuado (por ejemplo ADN o ARN aislado de una célula), secuencias de nucleótidos aisladas de una biblioteca (por ejemplo, una biblioteca de expresión), secuencias de nucleótidos preparadas introduciendo mutaciones en una secuencia de nucleótidos de origen natural (usando cualquier técnica conocida adecuada, por ejemplo PCR de desapareamiento), secuencia de nucleótidos preparada por PCR usando cebadores solapantes, o secuencias de nucleótidos que se han preparado usando técnicas para síntesis de ADN. También pueden usarse técnicas tales como maduración de afinidad (por ejemplo, partiendo de secuencias de inmunoglobulinas sintéticas, aleatorias o de origen natural), injertos de CDR, sustitución en superficie, combinación de fragmentos derivados de diferentes secuencias de inmunoglobulina y otras técnicas para modificación técnica de secuencias de inmunoglobulina.

45 Dichas secuencias de nucleótidos de interés pueden usarse *in vitro* o *in vivo* en la producción de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso en la invención, de acuerdo con técnicas bien conocidas por los expertos en la materia.

50 Para producción recombinante de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo monoclonal, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para clonación adicional o para expresión. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. Son células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores células procariontas, de levadura o eucariotas superiores tales como *E. coli* y células de mamífero tales como células CHO. Células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo glucosilado derivan de organismos multicelulares. Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación para producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

60 Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como una primera etapa, los residuos en partículas de células hospedadoras o células lisadas, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de sistemas de expresión en general se concentran en

primer lugar usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado. La composición de anticuerpos preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad.

- 5 Los anticuerpos purificados pueden después aislarse y opcionalmente prepararse en fragmentos de unión a antígeno o ligando y/o derivatizarse.

Enzimas

- 10 Cualquier enzima proteica es adecuada para su uso en la invención. Dicha enzima comprende un sitio activo y es capaz de unirse con un sustrato. La enzima puede ser un monómero que consiste en una cadena polipeptídica. Como alternativa, la enzima puede ser un dímero, tetrámero u oligómero que consiste en múltiples cadenas polipeptídicas. El dímero, tetrámero u oligómero puede ser un homo o heterodímero, tetrámero u oligómero respectivamente. Por ejemplo, la enzima puede necesitar formar un agregado (por ejemplo un dímero, tetrámero u oligómero) antes de conferirse actividad biológica completa o función enzimática. La enzima puede ser una enzima alostérica, una apoenzima o una holoenzima.

La enzima puede conjugarse con otro resto (por ejemplo, un ligando, anticuerpo, carbohidrato, molécula efectora o compañero de fusión de proteínas) y/o unirse con uno o más cofactores (por ejemplo, coenzima o grupo prostético).

- 20 El resto con el que se conjuga la enzima puede incluir lectina, avidina, un metabolito, una hormona, una secuencia de nucleótidos, un esteroide, una glucoproteína, un glucolípido o cualquier derivado de estos componentes.

25 Los cofactores incluyen compuestos inorgánicos (por ejemplo, iones metálicos tales como hierro, manganeso, cobalto, cobre, cinc, selenio, molibdeno) o compuestos orgánicos (por ejemplo flavina o hemo). Las coenzimas adecuadas incluyen riboflavina, tiamina, ácido fólico que puede portar hidruro de hierro (H⁻) portado por NAD o NADP⁺, el grupo acetilo portado por coenzima A, grupos formilo, metenilo o metilo portados por ácido fólico y el grupo metilo portado por S-adenosil metionina.

30 En otra realización, la enzima puede estar PEGilada especialmente si la enzima es una enzima terapéutica que se administra a un paciente. Por lo tanto, una o más moléculas de polietilenglicol pueden unirse covalentemente con la molécula enzimática. De una a tres moléculas de polietilenglicol pueden unirse covalentemente con cada molécula enzimática. Dicha PEGilación se usa predominantemente para reducir la inmunogenicidad de una enzima y/o aumentar la semi-vida en circulación de la enzima.

35 Una enzima adecuada incluye cualquier enzima clasificada según el sistema de clasificación de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular de números EC incluyendo una oxidorreductasa (EC 1), una transferasa (EC 2), una hidrolasa (EC 3), una liasa (EC 4), una isomerasa (EC 5) o una ligasa (EC 6). Una enzima típica es cualquier enzima que se use de forme industrial.

40 Una enzima que es específica para cualquier tipo de sustrato es adecuada para su uso en la presente invención. Los ejemplos de una enzima adecuada incluyen una α -galactosidasa, β -galactosidasa, luciferasa, serina proteinasa, endopeptidasa (por ejemplo, cisteína endopeptidasa), caspasa, quimasa, quimotripsina, endopeptidasa, granzima, papaína, elastasa pancreática, orizina, plasmina, renina, subtilisina, trombina, tripsina, triptasa, uroquinasa, amilasa (por ejemplo α -amilasa), xilanasas, lipasa, transglutaminasa, enzima degradante de la pared celular, glucanasa (por ejemplo β -glucanasa), glucoamilasa, enzima de coagulación, hidrolizado de proteína de la leche, enzima degradante de la pared celular, enzima de coagulación de la sangre, hementina, lisozima, enzima degradante de fibra, fitasa, celulasa, hemicelulasa, polimerasa, proteasa, mananasa o glucoamilasa.

50 Una enzima conservada de acuerdo con la invención puede ser por lo tanto una enzima terapéutica que se use para tratar una enfermedad u otra afección médica, una enzima usada en la industria para la producción de productos a granel tales como glucosa o fructosa, en el procesamiento de alimentos y análisis de alimentos, en detergentes de lavandería o lavavajillas automático, en las industrias textil, de pulpa, de papel y de piensos animales, como un catalizador en síntesis de productos químicos finos, en aplicaciones de diagnóstico tales como diagnóstico clínico, en biosensores o en ingeniería genética.

Las enzimas terapéuticas a las que puede aplicarse la presente invención incluyen:

- 60 - una DNasa, por ejemplo una DNasa I recombinante tal como Pulmozima o Dornasa que escinde el ADN en la mucosa pulmonar de niños que tienen fibrosis quística;
- una lipasa gástrica tal como Meripasa que es una lipasa gástrica de mamífero recombinante para el tratamiento de mala absorción de lípidos relacionada con insuficiencia de lipasa pancreática exocrina;
- una glucocerebrosidasa terminada en manosa tal como Cerezima que es una glucocerebrosidasa terminada en manosa recombinante para el tratamiento de enfermedad de Gaucher, un trastorno heredado que está provocado por una deficiencia en la enzima glucocerebrosidasa;
- 65 - α -galactosidasa que se usa en el tratamiento de la enfermedad de almacenamiento de glucógeno relacionada

enfermedad de Fabry;

- una adenosina desaminasa (ADA) tal como Pegademasa que se usa para tratar la deficiencia de ADA, una inmunodeficiencia combinada grave;
- una fenilalanina amoniaco liasa tal como la fenilalanina amoniaco liasa recombinante PEGilada Kuvan que se usa para el tratamiento de fenilcetonuria;
- activador de plasminógeno tisular, uroquinasa y estreptoquinasa que se usan en fibrinólisis de sangre para tratar coágulos sanguíneos;
- una urato oxidasa tal como Elitek (rasburicasa) que es una urato-oxidasa recombinante que se produce por una levadura modificada genéticamente y que se usa en el tratamiento o profilaxis de hiperuricemia en pacientes con leucemia o linfoma;
- L-asparaginasa que se usa en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda de la infancia;
- Factor VIIa, usado por pacientes con hemofilia;
- Factor IX que se usa en el tratamiento de hemofilia B; y
- una superóxido dismutasa tal como la superóxido dismutasa bovina Orgoteína que se usa para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica familiar.

Las enzimas para su uso en aplicaciones alimentarias tales como horneado incluyen amilasas, xilanasas, oxidorreductasas, lipasas, proteasas y transglutaminasa. Las enzimas para uso en la producción de zumos de frutas y procesamiento de frutas incluyen enzimas degradantes de la pared celular. Las enzimas para uso en la elaboración de cerveza incluyen α -amilasa bacteriana, β -glucanasa y glucoamilasa en la maceración, α -amilasa fúngica en la fermentación y cisteína endopeptidasa en la postfermentación. Las enzimas para uso en aplicaciones de lácteos incluyen enzimas de coagulación, lipasa, lisozima, hidrolizados de proteína de la leche, transglutaminasa y β -galactosidasa. Las enzimas para uso en composiciones de detergentes incluyen proteasas, amilasas, lipasas, celulasas y mananasa. Las enzimas para uso en pienso animal incluyen enzimas degradantes de fibras, fitasas, proteasas y amilasas. Las enzimas para uso en procesamiento de pulpa y papel incluyen celulasas y hemicelulasas.

La enzima puede como alternativa ser una enzima usada en aplicaciones de investigación y desarrollo. Por ejemplo, pueden usarse luciferasas para captura de imágenes en tiempo real de la expresión génica en cultivos celulares, células individuales y organismos completos. Además, pueden usarse luciferasas como proteínas indicadoras en estudios moleculares, por ejemplo para ensayar la actividad de transcripción de promotores específicos en células transfectadas con luciferasa. También pueden usarse enzimas en el diseño de fármacos por ejemplo en el ensayo de inhibidores enzimáticos en el laboratorio. Además, las enzimas pueden usarse en biosensores (por ejemplo, un biosensor de glucosa en sangre que usa glucosa oxidasa).

La enzima luciferasa puede ser una luciferasa de luciérnaga, escarabajo o mosca de las manzanas, o un derivado de las mismas. En particular, la luciferasa puede derivar de una luciérnaga norteamericana (*Phorinus pyralis*), *Luciola cruciata* (luciérnaga japonesa), *Luciola lateralis* (luciérnaga japonesa), *Luciola mingelica* (luciérnaga rusa), *Beneckeia hanegi* (luciferasa bacteriana marina), *Pyrophorus plagiophthalmus* (gusano de alambre), *Pyrocellia miyako* (luciérnaga) *Ragophthalmus ohbai* (mosca de las manzanas), *Pyrearinus termitilluminaans* (gusano de alambre), *Phrixothrix hirtus* (mosca de las manzanas), *Phrixothrix vivianii*, *Hotaria parvula* y *Photuris pensilvanica*, y variantes mutadas de las mismas.

Típicamente la α -galactosidasa o β -galactosidasa deriva de bacterias (tales como *Escherichia coli*), un mamífero (tal como ser humano, ratón, rata) u otro eucariota.

La enzima puede ser una enzima de origen natural o enzima sintética. Dichas enzimas pueden derivar de un animal, una planta o un microorganismo hospedador.

Las cepas microbianas usadas en la producción de enzimas puede ser cepas nativas o cepas mutantes que derivan de cepas nativas por cultivo en serie y selección, o mutagénesis y selección usando técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, el microorganismo puede ser un hongo, por ejemplo, *Thermomyces acermonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora* y *Trichoderma*. También pueden usarse levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* en la producción de enzimas para su uso en los métodos de la presente invención.

Una enzima sintética puede obtenerse usando técnicas de ingeniería proteica bien conocidas en este campo tales como diseño racional, evolución dirigida y redistribución de ADN.

Los organismos hospedadores pueden transformarse con una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima deseada y cultivarse en condiciones que conduzcan a la producción de la enzima y que faciliten la recuperación de la enzima de las células y/o el medio de cultivo.

Inmunógenos de vacuna

Un inmunógeno de vacuna adecuado para su uso en la invención incluye cualquier componente inmunogénico de una vacuna. El inmunógeno de vacuna comprende un antígeno que puede inducir una respuesta inmunitaria en un individuo cuando se usa como una vacuna contra una enfermedad o afección médica particular. El inmunógeno de

vacuna puede proporcionarse por sí solo antes de la formulación de una preparación de vacuna o puede proporcionarse como parte de una preparación de vacuna. El inmunógeno de vacuna puede ser una vacuna subunitaria, un conjugado útil como vacuna o un toxoide. El inmunógeno de vacuna puede ser una proteína, proteína específica bacteriana, mucoproteína, glucoproteína, péptido, lipoproteína, polisacárido, peptidoglucano, nucleoproteína o proteína de fusión.

El inmunógeno de vacuna puede proceder de un microorganismo (tal como una bacteria, un virus, un hongo), un protozoo, un tumor, una célula maligna, una planta, un animal, un ser humano o un alérgeno. El inmunógeno de vacuna preferentemente no es una partícula vírica. Por lo tanto, el inmunógeno de vacuna preferentemente no es virus completo o virión, partícula de tipo vírico (VLP) o nucleocápsida de virus. La conservación de dichas partículas víricas se describe en el documento WO 2008/114021.

El inmunógeno de vacuna puede ser sintético, por ejemplo como se obtiene usando técnicas de ADN recombinante. El inmunógeno puede ser un antígeno relacionado con enfermedad tal como un antígeno relacionado con patógeno, antígeno relacionado con tumor, antígeno relacionado con alergia, antígeno relacionado con defecto neural, antígeno de enfermedad cardiovascular, antígeno relacionado con artritis reumatoide.

En particular, el patógeno del que procede el inmunógeno de vacuna puede incluir virus del papiloma humano (VPH), VIH, VHS2/VHS1, virus de la gripe (tipos A, B y C), virus paragripal, virus de la polio, virus VSR, rinovirus, rotavirus, virus de la hepatitis A, virus Norwalk, enterovirus, astrovirus, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de varicela zóster, citomegalovirus, virus de Epstein-barr, adenovirus, virus de la rubeola, virus de linfoma de linfocitos T humano de tipo I (HTLV-I), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis D, poxvirus, virus vaccinia, *Salmonella*, *Neisseria*, *Borrelia*, *Clamidia*, *Bordetella* tal como *Bordetella pertussis*, *Plasmodium*, *Coxioplasmia*, *Pneumococcus*, *Meningococcus*, *Cryptococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia* y en particular *Yersinia pestis*, *Staphylococcus*, *Haemophilus*, Difteria, Tétanos, Pertussis, *Escherichia*, *Candida*, *Aspergillus*, *Entamoeba*, *Giardia* y *Trypanosoma*. La vacuna puede usarse además para proporcionar una respuesta inmunitaria adecuada contra numerosas enfermedades veterinarias tales como glosopeda (incluyendo los serotipos O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia-1), coronavirus, lengua azul, virus de la leucemia felina, gripe aviar, virus hendra y nipah, pestivirus, parvovirus canino y virus de la diarrea vírica bovina.

Los antígenos asociados con tumores incluyen por ejemplo, antígenos asociados con melanoma, antígenos asociados con cáncer de mama, antígenos asociados con cáncer colorrectal o antígenos asociados con cáncer de próstata.

Un antígeno relacionado con alérgeno incluye cualquier antígeno de alérgeno adecuado para su uso en una vacuna para suprimir una reacción alérgica en un individuo al que se administra la vacuna (por ejemplo antígenos derivados de polen, ácaros del polvo, insectos, alérgenos alimentarios, polvo, venenos, parásitos).

Inmunógenos de vacunas subunitarias

Un inmunógeno de vacuna subunitaria adecuado incluye cualquier subunidad inmunogénica de una proteína, lipoproteína o glucoproteína derivada de un microorganismo (por ejemplo un virus o una bacteria). Como alternativa, el inmunógeno de vacuna subunitaria puede proceder de un antígeno relacionado con enfermedad tal como una proteína relacionada con tumor. El inmunógeno de vacuna subunitaria puede ser una molécula de origen natural o una subunidad proteica sintética. El inmunógeno de vacuna puede ser una proteína, glucoproteína o lipoproteína vírica o bacteriana de longitud completa o un fragmento de la proteína, glucoproteína o lipoproteína vírica o bacteriana de longitud completa.

Una proteína vírica adecuada como un inmunógeno de vacuna subunitario puede derivar de una proteína vírica estructural o no estructural. Un inmunógeno subunitario vírico adecuado es capaz de estimular el sistema inmunitario de un sujeto incluso en ausencia de otras partes del virus. El inmunógeno de vacuna subunitario vírico adecuado incluye una proteína de la cápsida, glucoproteína de superficie, proteína de envoltura, proteína hexónica, proteína de fibra, proteína de cubierta o fragmento inmunogénico o derivado de dichas proteínas o glucoproteínas.

Por ejemplo, el inmunógeno de vacuna subunitario vírico puede consistir en una proteína de superficie del virus de la gripe A, B o C. En particular, el inmunógeno de vacuna puede ser una proteína hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína, M1, M2, NS1, NS2(NEP), PA, PB1, PB1-F2 y/o PB2, o un derivado inmunogénico o fragmento de cualquiera de estas proteínas. El inmunógeno puede ser HA1, HA2, HA3, HA4, HA5, HA6, HA7, HA8, HA9, HA10, HA11, HA12, HA13, HA14, HA15 y/o HA16, cualquier fragmento inmunogénico o derivado de los mismos y cualquier combinación de las proteínas, fragmentos o derivados de HA. La neuraminidasa puede ser neuraminidasa 1 (N1) o neuraminidasa 2 (N2).

El inmunógeno de vacuna subunitaria vírico puede ser una proteína de la envoltura vírica del virus de la hepatitis B o un fragmento o derivado de la misma. Por ejemplo, el inmunógeno de vacuna subunitaria puede ser el antígeno de superficie de la hepatitis B (HbsAg) o un fragmento inmunogénico o derivado del mismo.

Típicamente, el inmunógeno de vacuna subunitaria bacteriano es una proteína de la pared celular bacteriana (por ejemplo, flagelina, proteína de la membrana externa, proteína de superficie externa), un antígeno de polisacárido (por ejemplo de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*), toxina o un fragmento inmunogénico o derivado de dichas proteínas, polisacáridos o toxinas.

5 Los derivados de proteínas de origen natural incluyen proteínas con la adición, sustitución y/o supresión de uno o más aminoácidos. Dichas modificaciones de aminoácidos pueden generarse usando técnicas conocidas en este campo, tales como mutagénesis dirigida.

10 El inmunógeno de vacuna subunitario puede ser una proteína de fusión que comprende un compañero de proteína de fusión unido por ejemplo con una proteína bacteriana o vírica o un fragmento inmunogénico o derivado de la misma. Un compañero de proteína de fusión adecuado puede evitar el ensamblaje de proteínas de fusión víricas en formas multiméricas después de la expresión de la proteína de fusión. Por ejemplo, el compañero de proteína de fusión puede evitar la formación de estructuras de tipo vírico que podrían formarse espontáneamente si la proteína
15 vírica se expresa de forma recombinante en ausencia del compañero de proteína de fusión. Un compañero de fusión adecuado también puede facilitar la purificación de la proteína de fusión, o potenciar la expresión recombinante del producto de proteína de fusión. La proteína de fusión puede ser proteína de unión a maltosa, segmento de polihistidina capaz de unirse con iones metálicos, antígenos con los que se unen anticuerpos. S-Tag, glutatión S-transferasa, tiorredoxina, beta-galactosidasa, marcadores epitópicos, proteína verde fluorescente, estreptavidina o
20 dihidrofolato reductasa.

Puede prepararse un inmunógeno de vacuna subunitario usando técnicas conocidas en este campo para la preparación de por ejemplo, péptidos aislados, proteínas, lipoproteínas o glucoproteínas. Por ejemplo, un gen que codifica una proteína recombinante de interés puede identificarse y aislarse de un patógeno y expresarse en *E. coli* o
25 algún otro hospedador adecuado para producción en masa de proteínas. Después la proteína de interés se aísla y purifica de la célula hospedadora (por ejemplo mediante purificación usando cromatografía de afinidad).

En el caso de inmunógenos subunitarios víricos, la subunidad puede purificarse a partir de la partícula vírica después de aislar la partícula vírica, o mediante clonación de ADN recombinante y expresión de la proteína subunitaria vírica en una célula hospedadora adecuada. Una célula hospedadora adecuada para preparar partículas víricas debe poder infectarse con el virus y producir los antígenos víricos deseados. Dichas células hospedadoras pueden incluir microorganismos, células animales cultivadas, plantas transgénicas o larvas de insectos. Algunas proteínas de interés pueden secretarse como una proteína soluble de la célula hospedadora. En el caso de envoltura vírica o proteínas de superficie, dichas proteínas pueden necesitar solubilizarse con un detergente para extraerlas de
30 la envoltura vírica, seguido de separación de fases para retirar el detergente.

Un inmunógeno de vacuna subunitario puede combinarse en la misma preparación y conservarse junto con uno, dos, tres o más inmunógenos de vacuna subunitarios adicionales.

40 *Toxoides*

La invención puede aplicarse a toxoides. Un toxoide es una toxina, por ejemplo derivada de un patógeno, animal o planta, que es inmunogénica pero se ha inactivado (por ejemplo por mutación genética, tratamiento químico o por conjugación con otro resto) para eliminar la toxicidad al sujeto diana. La toxina puede ser, por ejemplo, una proteína,
45 lipoproteína, polisacárido, lipopolisacárido o glucoproteína. El toxoide puede ser por lo tanto una endotoxina o una exotoxina que se ha convertido en toxoide.

El toxoide puede ser un toxoide derivado de una toxina bacteriana tal como una toxina del tétanos, toxina de difteria, toxina de pertussis, toxina botulínica, toxina de *C. difficile*, toxina del cólera, toxina shiga, toxina de carbunco, citolisinas bacterianas o pneumolisina y fragmentos o derivados de las mismas. El toxoide puede ser por lo tanto toxoide de tétanos, toxoide de difteria o toxoide de pertussis. Otras toxinas de las que puede derivar un toxoide incluyen venenos aislados de animales o plantas, por ejemplo de *Crotalis atrox*. Típicamente el toxoide deriva de toxina botulínica o toxina de carbunco. Por ejemplo, la toxina botulínica puede derivar de *Clostridium botulinum* de serotipo A, B, C, D, E, F o G. El inmunógeno de vacuna derivado de una toxina botulínica puede combinarse en la
50 misma preparación y conservarse junto uno o más inmunógenos de vacuna adicionales derivados de una toxina botulínica (por ejemplo una combinación de inmunógenos derivados de serotipos botulínicos A, B, C, D, E, F o G, tales como por ejemplo A, B y E).

La toxina del carbunco puede derivar de una cepa de *Bacillus anthracis*. El toxoide puede consistir en uno o más componentes de la toxina de carbunco, o derivados de dichos componentes, tales como antígeno protector (PA), el factor de edema (EF) y el factor letal (LF). Típicamente el toxoide derivado de la toxina de carbunco consiste en antígeno protector (PA).

El toxoide puede conjugarse con otro resto, por ejemplo como una proteína de fusión, para su uso como una
65 vacuna de toxoide. Un resto adecuado en un toxoide conjugado incluye una sustancia que ayuda a la purificación del toxoide (por ejemplo marcador de histidina) o reduce la toxicidad a un sujeto diana. Como alternativa, el toxoide

puede actuar como un adyuvante aumentando la inmunogenicidad de un antígeno con el que está unido. Por ejemplo, el polisacárido B de *Haemophilus influenzae* puede combinarse con toxoide de difteria.

5 Un inmunógeno de vacuna puede combinarse en la misma preparación y conservarse junto con uno, dos, tres o más inmunógenos de vacuna. Por ejemplo, un toxoide de difteria puede conservarse con toxoide del tétanos y vacuna de pertussis (DPT). El toxoide de difteria puede conservarse solamente con toxoide del tétanos (DT), o el toxoide de la difteria puede conservarse con toxoide de difteria, toxoide del tétanos y Pertussis acelular (DTaP).

10 Los expertos en la materia conocen bien técnicas para la preparación de toxoides. Los genes de toxina pueden clonarse y expresarse en una célula hospedadora adecuada. El producto de toxina se purifica después y puede convertirse en toxoide químicamente, por ejemplo usando formalina o glutaraldehído. Como alternativa, un gen de toxina puede modificarse técnicamente para que codifique una toxina que tenga toxicidad reducida o no tenga toxicidad, por ejemplo, mediante la adición, supresión y/o sustitución de uno o más aminoácidos. La toxina modificada puede expresarse después en una célula hospedadora adecuada y aislarse. La toxicidad de genes de
15 toxina también puede inactivarse por conjugación de genes de toxina o fragmentos de los mismos con un resto adicional (por ejemplo polisacárido o polipéptido).

Inmunógenos de vacuna conjugados

20 Un inmunógeno de vacuna conjugado puede ser un conjugado de un antígeno (por ejemplo un polisacárido u otro hapteno) con un resto vehículo (por ejemplo un péptido, polipéptido, lipoproteína, glucoproteína, mucoproteína o cualquier derivado o fragmento inmunoestimulante del mismo) que estimule la inmunogenicidad del antígeno con el que se une. Por ejemplo, el inmunógeno de vacuna conjugado puede ser una proteína recombinante, lipoproteína recombinante o glucoproteína recombinante conjugada con un inmunógeno de interés (por ejemplo un polisacárido).

25 El inmunógeno de vacuna conjugado puede usarse en una vacuna contra *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, meningococo (cepas A, B, C, X, Y y W135) o cepas neumocócicas. Por ejemplo, la vacuna puede ser, por ejemplo, la Vacuna Conjugada CRM₁₉₇ Pneumocócica heptavalente (PCV7), una MCV-4 o vacuna de *Haemophilus influenzae* de tipo B (Hib).

30 Un inmunógeno de vacuna conjugado puede combinarse en la misma preparación y conservarse junto con uno, dos, tres o más inmunógenos de vacuna conjugados adicionales.

35 Se conocen bien en la técnica métodos para la preparación de conjugados de polisacárido-proteína conjugados. Por ejemplo, puede producirse conjugación mediante un enlazador (por ejemplo, B-propionamido, nitrofenil-etilamina, haloalquil haluros, enlaces glucosídicos).

Compuestos de fórmula (I) o sales o ésteres fisiológicamente aceptables de los mismos y compuestos de fórmula (II) o sales o ésteres fisiológicamente aceptables de los mismos

40 Los compuestos de fórmula (I) y (II) pueden estar presentes como una sal o un éster fisiológicamente aceptable de los mismos.

45 La sal es típicamente una sal con un ácido fisiológicamente aceptable y por lo tanto incluye las formadas con un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico o sulfúrico o un ácido orgánico tal como ácido cítrico, tartárico, málico, maleico, mandélico, fumárico o metanosulfónico. Se prefiere la sal de clorhidrato.

50 El éster es típicamente un alquil éster C₁₋₆, preferentemente un alquil éster C₁₋₄. El éster puede ser por lo tanto el metil, etil, propil, isopropil, butil, isobutil o *terc*-butil éster. Se prefiere el etil éster.

Como se usa en el presente documento, un grupo de alquilo C₁₋₆ es preferentemente un grupo de alquilo C₁₋₄. Se seleccionan grupos de alquilo preferidos de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo y *terc*-butilo. Se prefieren particularmente metilo y etilo.

55 Para evitar las dudas, las definiciones de los compuestos de fórmula (I) y fórmula (II) también incluyen compuestos en los que el anión carboxilato se protona para proporcionar -COOH y el catión de amonio o sulfonio se asocia con un anión farmacéuticamente aceptable. Además, para evitar las dudas, los compuestos definidos anteriormente pueden usarse en cualquier forma tautomérica o enantiomérica.

60 *Compuestos de fórmula (I)*

En una realización preferida R₁ representa H, R₂ representa H y R₃ representa alquilo C₁₋₄. En otras palabras, en esta realización el compuesto de fórmula (I) es una alquil-glicina N-C₁₋₄ o sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma. Se seleccionan grupos alquilo preferidos de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo y *terc*-butilo. Se
65 prefieren más metilo y etilo. Se prefiere en particular N-metilglicina, también denominada sarcosina.

En otra realización preferida R_1 representa H, R_2 representa alquilo C_{1-4} y R_3 representa alquilo C_{1-4} . En otras palabras, en esta realización el compuesto de fórmula (I) es una N,N-di(C_{1-4} alquil)-glicina o sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma. Se seleccionan grupos alquilo preferidos de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo y *tert*-butilo. Se prefieren más metilo y etilo. Se prefiere en particular N,N-dimetilglicina, que también se denomina dimetilglicina (DMG) y/o ácido 2-(dimetilamino)-acético.

En otra realización preferida, R_1 representa alquilo C_{1-4} , R_2 representa alquilo C_{1-4} y R_3 representa alquilo C_{1-4} . En otras palabras, en esta realización el compuesto de fórmula (I) es una N,N-di(C_{1-4} alquil)-glicina o sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma. Se seleccionan grupos alquilo preferidos de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo y *tert*-butilo. Se prefieren más metilo y etilo. Se prefiere en particular N,N,N-trimetilglicina, que también se denomina trimetilglicina (TMG).

Compuestos de fórmula (II)

Típicamente R_a y R_b representan de forma independiente metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo o *tert*-butilo, más preferentemente metilo o etilo.

Un compuesto de sulfona preferida es metilsulfonilmetano (MSM), que también se conoce como dimetilsulfona (DMSO₂).

Azúcares

Los azúcares adecuados para su uso en la presente invención incluyen azúcares reductores tales como glucosa, fructosa, gliceraldehídos, lactosa, arabinosa y maltosa; y preferentemente azúcares no reductores tales como sacarosa y rafinosa, más preferentemente sacarosa. El azúcar puede ser un monosacárido, disacárido, trisacárido u otros oligosacáridos. El término "azúcar" incluye alcoholes de azúcar. En una realización, por lo tanto, se prefiere el uso de un azúcar no reductor o un alcohol de azúcar.

Se prevén monosacáridos tales como galactosa y manosa; disacáridos tales como sacarosa, lactosa y maltosa; trisacáridos tales como rafinosa; y tetrasacáridos tales como estaquiosa. También son adecuados para su uso en la presente invención trehalosa, umbelífera, verbascosa, isomaltosa, celobiosa, maltulosa, turanosa, melezitosa y melibiosa. Un alcohol de azúcar adecuado es manitol. Cuando se usa manitol, pueden obtenerse tortas de apariencia mejorada al liofilizar.

La presencia de azúcar puede actuar para mejorar la estabilidad. La adición de azúcar también puede proporcionar otros beneficios tales como una torta de liofilización alterada y mejora de la solubilidad para reconstitución más rápida. En general uno o más azúcares están presentes cuando se usa liofilización. Cuando se usa un azúcar, el azúcar es preferentemente sacarosa o manitol, más preferentemente manitol.

La conservación de actividad vírica es particularmente eficaz cuando se usan dos o más azúcares en la mezcla de conservación. Pueden usarse dos, tres o cuatro azúcares. Preferentemente, la solución acuosa es una solución de sacarosa y rafinosa. Por lo tanto, cuando se usan dos o más azúcares los azúcares comprenden preferentemente sacarosa, más preferentemente sacarosa y rafinosa. La sacarosa es un disacárido de glucosa y fructosa. La rafinosa es un trisacárido compuesto de galactosa, fructosa y glucosa.

Procedimiento de conservación

En la presente invención, se seca una solución acuosa que comprende el polipéptido, uno o más azúcares y un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo. Puede usarse cualquier solución acuosa adecuada. La solución puede estar tamponada. La solución puede ser una solución de HEPES, tamponada con fosfato, tamponada con Tris o de agua pura. La solución puede comprender opcionalmente uno o más co-disolventes. Un ejemplo de un co-disolvente es *t*-butil alcohol.

La solución puede tener un pH de 2 a aproximadamente 12 y puede tamponarse. La solución puede tamponarse con tampón de HEPES, tampón fosfato, tampón Tris, tampón de citrato sódico, tampón de bicina (es decir, tampón de N,N-bis(2-hidroxietil)glicina) o tampón de MOPS (es decir, tampón de ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico). La solución puede contener o no NaCl. La solución puede ser por lo tanto una solución tamponada con citrato sódico salino (SSC).

Es preferible que la solución acuosa para secar no comprenda (a) un adyuvante de sal de aluminio y/o (b) un tensioactivo no iónico tal como polisorbato (por ejemplo polisorbato 8) y/o (c) etilen-diamina, cadaverina, putrescina, espermidina o espermina.

En general una preparación del polipéptido se mezcla con la mezcla de conservación, es decir, con una solución acuosa de un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto

de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y uno, dos o más azúcares. La mezcla de conservación puede en sí misma estar tamponada. Puede ser una solución de HEPES, tamponada con fosfato, tamponada con Tris o de agua pura.

5 Por lo tanto, típicamente en la presente invención, se seca una solución acuosa tamponada que comprende (i) el polipéptido y (ii) o uno o más azúcares y un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo como los únicos excipientes.

10 Típicamente en la presente invención, se seca una solución acuosa tamponada que comprende (i) el polipéptido y (ii) uno o más azúcares y un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo como los únicos solutos.

15 Como alternativa, la solución acuosa puede consistir típicamente, o consistir esencialmente, en un polipéptido, un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo, y uno o más azúcares.

20 La concentración de azúcar, o la concentración de azúcar total si está presente más de un azúcar, en la solución acuosa para secar es de 0,05 M a 3 M. En general la concentración de azúcar, o la concentración de azúcar total si está presente más de un azúcar, es de al menos 0,1 M, al menos 0,2 M o al menos 0,5 M hasta 2,5 M, 2 M, 1,5 M o 1 M. La concentración de azúcar, o la concentración de azúcar total si está presente más de un azúcar puede variar por lo tanto, por ejemplo, de 0,1 M a 3 M, de 0,2 M a 2 M o de 0,3 M a 1 M.

25 Cuando está presente más de un azúcar, preferentemente uno de esos azúcares es sacarosa. La sacarosa puede estar presente a una concentración de 0,05 M, 0,1 M, 0,25 M o 0,5 M hasta 3 M, 2,5 M o 2 M. Se prefiere en particular una concentración de sacarosa de 0,1 a 1 M, por ejemplo de 0,1 a 0,3 M o de 0,3 a 0,7 M o de 0,7 M o 1 M.

30 La relación de la concentración molar de sacarosa en relación con la concentración molar del otro azúcar o los otros azúcares es típicamente de 1:1 a 20:1 tal como de 5:1 a 15:1. En el caso de que estén presentes dos azúcares y en particular cuando estén presentes sacarosa y rafinosa, por lo tanto, la relación de concentraciones molares de sacarosa es típicamente de 1:1 a 20:1 tal como de 5:1 a 15:1 y preferentemente aproximadamente 10:1.

35 Cuando está presente un azúcar, preferentemente el azúcar es manitol. El manitol puede estar presente a una concentración de 0,05 M, 0,1 M, 0,25 M o 0,5 M hasta 3 M, 2,5 M, 2 M, 1,5 M o 1 M. Preferentemente la concentración de manitol es de 0,1 M a 1 M, más preferentemente de 0,3 M a 0,7 M, por ejemplo de 0,4 M a 0,6 M.

40 La concentración del compuesto de fórmula (I) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo, cuando está presente, es de 0,001 M a 2,5 M, preferentemente de 0,01 M a 2 M, más preferentemente de 0,01 a 1,5 M. Por ejemplo, el intervalo de concentración puede ser de 0,1 M a 1 M, preferentemente de 0,3 M a 0,7 M.

45 La concentración del compuesto de fórmula (II) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo, cuando está presente, es de 0,001 M a 2,5 M, preferentemente de 0,01 M a 2 M, más preferentemente de 0,01 a 1,5 M. Por ejemplo, el intervalo de concentración puede ser de 0,1 M a 1 M, preferentemente del 0,3 M a 0,7 M.

50 Cuando un compuesto de compuesto de fórmula (I) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo y un compuesto de fórmula (II) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo están presentes, los compuestos pueden estar presentes en cantidades que dan como resultado sinergia. Típicamente, (a) la concentración del compuesto de fórmula (I) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo es de 0,01 M a 2 M, preferentemente de 0,01 a 1,5 M, y (b) la concentración del compuesto de fórmula (II) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo es de 0,01 M a 2 M, preferentemente de 0,01 a 1,5 M. Por ejemplo, la concentración del compuesto de fórmula (I) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo puede ser de 0,1 M a 1 M, preferentemente de 0,3 a 0,7 M, y la concentración del compuesto de fórmula (II) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo puede ser de 0,1 M a 1 M, preferentemente de 0,3 a 0,7 M.

55 Cuando un compuesto de fórmula (I) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo está presente en la solución, opcionalmente pueden estar presentes uno o más, preferentemente uno, compuestos adicionales de fórmula (I) o sales o ésteres fisiológicamente aceptables de los mismos. La concentración de cada compuesto de fórmula (I) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo es preferentemente como se ha expuesto anteriormente. Típicamente, cuando hay dos de dichos compuestos, los compuestos son DMG o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y TMG o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo.

65 Cuando está presente en la solución un compuesto de un compuesto de fórmula (II) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo, opcionalmente pueden estar presentes uno o más, preferentemente uno, compuestos adicionales de fórmula (II) o sales o ésteres fisiológicamente aceptables de los mismos. La concentración de cada compuesto de fórmula (II) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo es preferentemente como se ha

expuesto anteriormente.

Preferentemente, cuando está presente un azúcar que es manitol, se usa un compuesto de fórmula (I) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo, por ejemplo DMG.

5 Preferentemente, cuando están presentes dos azúcares que son sacarosa y rafinosa, se usan un compuesto de fórmula (I) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo (tal como DMG) y un compuesto de fórmula (II) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo (tal como MSM).

10 Las soluciones acuosas particularmente preferidas para su uso en la invención comprenden, además del polipéptido, los siguientes componentes:

- de 0,3 a 0,7 M de un alcohol de azúcar, preferentemente manitol, por ejemplo de 0,4 a 0,6 M o aproximadamente 0,5 M; y de 0,1 M a 1,5 M de un compuesto de fórmula (I) o sal o éster fisiológicamente aceptable, preferentemente DMG o TMG, por ejemplo de 0,3 M a 1 M o aproximadamente 0,7 M o aproximadamente 0,8 M;
- 15 • sacarosa de 0,01 a 0,5 M, por ejemplo de 0,05 a 0,15 M o aproximadamente 0,1 M; rafinosa de 0,001 a 0,05 M, por ejemplo de 0,005 a 0,015 M o aproximadamente de 0,01 M; de 0,05 M a 1,5 M de un compuesto de fórmula (I) o sal o éster fisiológicamente aceptable, preferentemente DMG, por ejemplo de 0,1 M a 1,2 M, o aproximadamente 1 M; y de 0,05 M a 1,5 M de un compuesto de fórmula (II) o sal o éster fisiológicamente aceptable, preferentemente MSM, por ejemplo de 0,1 M a 1,2 M, o aproximadamente 0,1 M, aproximadamente 0,3 M, aproximadamente 0,7 M o aproximadamente 1 M;
- 20 • sacarosa de 0,1 a 1,0 M, por ejemplo aproximadamente 0,15 M o aproximadamente 0,45 M; rafinosa de 0,1 a 0,5 M, por ejemplo aproximadamente 0,2 M o aproximadamente 0,25 M; y de 0,05 a 1,5 M de un compuesto de fórmula (I) o sal fisiológicamente aceptable, preferentemente DMG, por ejemplo de 0,1 M a 1,3 M, o aproximadamente 0,6 M o aproximadamente 1,3 M;
- 25 • sacarosa de 0,1 a 1,8 M, por ejemplo de 1,1 a 1,6 M o aproximadamente 1,1 M o 1,2 M o 1,4 M; rafinosa de 0,01 a 0,5 M, por ejemplo de 0,05 a 0,3 M o aproximadamente 0,15 M; y de 0,1 de 0,5 M de un compuesto de fórmula (I) o sal o éster fisiológicamente aceptable, preferentemente TMG, por ejemplo de 0,2 M a 0,4 M, o aproximadamente 0,1 M; o
- 30 • de 0,3 a 0,7 M de un alcohol de azúcar, preferentemente manitol, por ejemplo de 0,4 a 0,6 M o aproximadamente 0,5 M; de 0,1 M a 1,5 M de un compuesto de fórmula (I) o sal fisiológicamente aceptable, preferentemente DMG, por ejemplo de 0,3 M a 1 M o aproximadamente 0,6 M; y de 0,1 M a 1,5 M de un segundo compuesto de fórmula (I) o sal fisiológicamente aceptable, preferentemente TMG, por ejemplo de 0,3 M a 1 M o aproximadamente 0,5 M.

35 La concentración del compuesto de fórmula (I) o sal y/o éster fisiológicamente aceptable del mismo o compuesto de fórmula (II) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo que se emplea dependerá de varios factores, incluyendo del tipo de partícula polipeptídica para conservar; el compuesto particular que se use; si están presentes uno, dos o más azúcares y la identidad del azúcar o los azúcares; y el procedimiento y condiciones de secado. De forma similar, la selección y concentración de azúcares también dependerá de la partícula polipeptídica para conservar; los excipientes seleccionados; y el procedimiento y las condiciones de secado. Los compuestos específicos de fórmula (I) o sal y/o éster fisiológicamente aceptable de los mismos, o compuesto de fórmula (II) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo, la concentración de estos compuestos y el azúcar o los azúcares y su concentración pueden seleccionarse por lo tanto por experimentación rutinaria para conseguir la mejor estabilidad.

45 Liofilización usada en la presente invención. Reduciendo el agua en el material y sellado el material en un vial, el material puede almacenarse fácilmente, enviarse y después reconstituirse a su forma original. Las condiciones de secado pueden optimizarse convenientemente mediante experimentación rutinaria.

50 Al secar, se forma una composición que incorpora el polipéptido. Se produce una matriz que incorpora el polipéptido. La composición es típicamente un sólido amorfo. Se forma de este modo en general una matriz sólida, generalmente una matriz sólida amorfa. Por "amorfo" se entiende no estructurado y que no tiene una organización regular o repetida observable de moléculas (es decir no cristalina).

55 El azúcar o los azúcares proporcionan la matriz amorfa en la composición seca. El compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo se dispersan en la matriz de azúcar. El compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o compuesto de fórmula (II) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo se incorporan de este modo dentro de la matriz de azúcar. El polipéptido se incorpora también dentro de la matriz de azúcar. El procedimiento de secado puede de este modo efectuarse por ejemplo por liofilización para formar una torta amorfa dentro de la que se incorpora el polipéptido.

65 Cuando se secan soluciones acuosas que comprenden azúcar, el azúcar puede cristalizar durante la etapa de secado, en lugar de adoptar una estructura amorfa. Por ejemplo, el manitol puede formar tres formas cristalinas anhidras (alfa, beta y delta-manitol), un hemihidrato así como una forma de manitol amorfa. El manitol forma con

frecuencia un meta-vidrio inestable durante la liofilización, que se revierte a una forma cristalina. Por lo tanto, por ejemplo, cuando se seca una solución acuosa de manitol en ausencia de los excipientes de la invención, el manitol generalmente adopta una estructura cristalina o una de vidrio meta-estable en lugar de una estructura amorfa estable. El uso de una etapa de hibridación puede promover la formación de manitol cristalino. La presencia de compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o sal o éster fisiológicamente aceptable en la solución para secado puede evitar la formación de una estructura de azúcar cristalina, de modo que el azúcar adopte una estructura amorfa. Por ejemplo, DMG típicamente evita que el manitol cristalice cuando se seca una solución de la invención que comprende manitol y DMG.

La etapa de secado se realiza en general en cuanto se haya preparado la solución acuosa o poco después. Como alternativa, la solución acuosa se almacena típicamente antes de la etapa de secado. El polipéptido en la solución acuosa se conserva por el compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo y, opcionalmente, uno o más azúcares durante el almacenamiento.

La solución acuosa, o solución intermedia a granel, se almacena en general durante hasta 5 años, por ejemplo hasta 4 años, 3 años, 2 años o 1 año. Preferentemente la solución se almacena durante hasta 6 meses, más preferentemente hasta 3 meses o hasta 2 meses, por ejemplo de 1 día a 1 mes o de 1 día a 1 semana. Antes del secado, la solución se almacena típicamente en un refrigerador o en un congelador. La temperatura de un refrigerador es típicamente de 2 a 8 °C, preferentemente de 4 a 6 °C, o por ejemplo aproximadamente 4 °C. La temperatura de un congelador es típicamente de -10 a -80 °C, preferentemente de -10 a -30 °C, por ejemplo de aproximadamente -20 °C.

La solución se almacena típicamente en un recipiente sellado, preferentemente un recipiente de plástico inerte sellado, tal como una bolsa o un frasco. El recipiente es típicamente estéril. El volumen de la solución intermedia a granel es típicamente de 0,1 a 100 litros, preferentemente de 0,5 a 100 litros, por ejemplo de 0,5 a 50 litros, de 1 a 20 litros o de 5 a 10 litros. El recipiente típicamente tiene un volumen de 0,1 a 100 litros, preferentemente de 0,5 a 100 litros, por ejemplo de 0,5 a 50 litros, de 1 a 20 litros o de 5 a 10 litros.

La solución intermedia a granel almacenada se vierte típicamente en una bandeja de liofilización antes de la etapa de secado.

El almacenamiento estable de la solución aumenta la flexibilidad del proceso de fabricación. Por lo tanto, la solución puede almacenarse, enviarse y posteriormente secarse fácilmente.

Liofilización

La liofilización es un proceso de deshidratación usado típicamente para conservar material perecedero o hacer al material más conveniente para transporte. La liofilización representa una etapa clave para fabricar productos farmacéuticos de vacuna y proteína sólida. Sin embargo, los materiales biológicos están sujetos a tensiones tanto de congelación como de secado durante el procedimiento, que son capaces de desplegar o desnaturar las proteínas. Además, la velocidad de difusión de vapor de agua del material biológico congelado es muy baja y por lo tanto el proceso consume mucho tiempo. La técnica de conservación de la presente invención permite proteger materiales biológicos contra las tensiones de desecación y/o térmicas del procedimiento de liofilización.

Hay tres etapas principales de esta técnica, concretamente congelación, secado primario y secado secundario. La congelación se realiza típicamente usando una máquina de liofilización. En esta etapa, es importante enfriar el material biológico por debajo de su punto eutéctico (Teu) en el caso de productos cristalinos sencillos o temperatura de transición de vidrio (Tg') en el caso de productos amorfos, es decir por debajo de la temperatura menor a la que la fase sólida y líquida del material pueden coexistir. Esto asegura que se produzca sublimación en lugar de fusión en el estado de secado primario siguiente.

Durante el secado primario la presión se controla por la aplicación de niveles apropiados de vacío mientras que se proporciona suficiente calor para permitir que el agua se sublime. Se sublima en esta etapa al menos el 50 %, típicamente del 60 al 70 % del agua en el material. El secado primario puede ser lento ya que demasiado calor podría degradar o alterar la estructura del material biológico. Una cámara condensadora fría y/o placas condensadoras proporcionan superficies en las que el vapor de agua se atrapa por resolidificación.

En el proceso de secado secundario, se retira agua de hidratación por la aplicación adicional de calor. Típicamente, la presión también se reduce para potenciar el secado adicional. Después de completar el proceso de liofilización, el vacío puede romperse con un gas inerte tal como nitrógeno antes del sellado o el material puede sellarse al vacío.

Composición seca

Puede obtenerse una composición que tiene un contenido de humedad residual bajo. Se consigue un nivel de contenido de humedad residual que ofrece conservación a largo plazo a temperaturas mayores que las de

refrigeración, por ejemplo dentro del intervalo de 4 °C a 56 °C o más, o menores que las temperaturas de refrigeración, por ejemplo dentro del intervalo de 0 a -70 °C o por debajo. La composición seca puede tener por lo tanto contenido de humedad residual del 10 % o menos, 5 % o menos, 2 % o menos o 1 % o menos en peso. Preferentemente el contenido de humedad residual es de 0,5 % o más, 1 % o más. Típicamente una composición

5 seca tiene un contenido de humedad residual de 0,5 a 10 % en peso y preferentemente de 1 a 5 % en peso.

La composición puede obtenerse en una forma de polvo seco. Una torta resultante de la liofilización puede molerse en forma de polvo. Una composición sólida de acuerdo con la invención puede tomar por lo tanto la forma de partículas de libre flotación. La composición sólida se proporciona típicamente como un polvo en un vial sellado, una

10 ampolla o una jeringa. Si es para inhalación, el polvo puede proporcionarse en un inhalador de polvo seco. La matriz sólida puede como alternativa proporcionarse como un parche. Un polvo puede comprimirse en una forma de comprimido.

La composición puede consistir típicamente, o consistir esencialmente, en polipéptido, un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo, y opcionalmente uno o más azúcares.

15

Secado en un soporte sólido

Sin embargo, en una realización adicional del método de la invención, la mezcla que comprende un polipéptido se seca en un soporte sólido. El soporte sólido puede comprender una perla, un tubo de ensayo, una matriz, un soporte de plástico, una placa de microtitulación, una microplaca (por ejemplo, microplaca de silicio, silicio-vidrio u oro) o membrana. En otra realización, se proporciona un soporte sólido en el que se seca o se une una partícula polipeptídica conservada de acuerdo con los métodos de la presente invención.

20

Excipiente

25

También se proporciona un excipiente para la conservación de un polipéptido. El excipiente comprende (a) opcionalmente uno o más azúcares tales como sacarosa, rafinosa, estaquiosa, trehalosa, o un alcohol de azúcar o cualquier combinación de los mismos; y (b) un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo. Preferentemente están presentes uno o más azúcares. Preferentemente el excipiente consiste, o consiste esencialmente en estos componentes.

30

Por "excipiente" se entiende una sustancia inactiva usada como un vehículo para el polipéptido de la invención. Típicamente, el polipéptido se disuelve en o se mezcla con el excipiente, que actúa como un conservante del polipéptido y/o en algunos contextos ayuda la administración y absorción en el cuerpo. Además de la mezcla de conservación de la presente invención, un excipiente también puede comprender otros conservantes tales como antioxidantes, lubricantes y aglutinantes bien conocidos en la técnica, siempre que esos ingredientes no reduzcan significativamente la eficacia de la mezcla de conservación de la presente invención.

35

40

Puede obtenerse una composición que tenga un contenido de humedad residual bajo. Se consigue un nivel de contenido de humedad residual que ofrece conservación a largo plazo a temperaturas mayores que las de refrigeración, por ejemplo, dentro del intervalo de 4 °C a 56 °C o más, o menores que las temperaturas de refrigeración, por ejemplo dentro del intervalo de 0 a -70 °C o menor. La composición seca puede tener por lo tanto contenido de humedad residual de 10 % o menos, 5 % o menos, 2 % o menos o 1 % o menos en peso. Preferentemente el contenido de humedad residual es de 0,5 % o más, 1 % o más. Típicamente una composición seca tiene un contenido de humedad residual de 0,5 a 10 % en peso y preferentemente de 1 a 5 % en peso.

45

La composición puede obtenerse en una forma de polvo seco. Una torta resultante de liofilización puede molerse en forma de polvo. Una composición sólida de acuerdo con la invención puede tomar por lo tanto la forma de partículas de libre flotación. La composición sólida se proporciona típicamente como un polvo en un vial sellado, una ampolla o una jeringa. Si es para inhalación, el polvo puede proporcionarse en un inhalador de polvo seco. La matriz sólida puede como alternativa proporcionarse como un parche. Un polvo puede comprimirse en forma de comprimido.

50

La composición puede consistir típicamente, o consistir esencialmente, en polipéptido, un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo, y opcionalmente uno o más azúcares.

55

Composición

60

Las composiciones de la invención son sólidas y liofilizadas.

De esta manera, puede obtenerse una composición que tenga un contenido de humedad residual bajo. Se consigue un nivel de contenido de humedad residual que ofrece conservación a largo plazo a temperaturas mayores que las de refrigeración, por ejemplo dentro del intervalo de 4 °C a 56 °C o más, o menores que las temperaturas de

65

refrigeración, por ejemplo dentro del intervalo de 0 a -70 °C o menor. La composición sólida seca tiene por lo tanto típicamente un contenido de humedad residual del 10 % o menos, 5 % o menos, 2 % o menos o 1 % menos en peso. Preferentemente, el contenido de humedad residual es del 0,5 % o más, 1 % o más.

- 5 Típicamente la composición se obtiene en una forma de polvo seco. Preferentemente la composición está en forma de una torta, resultante de la liofilización ejemplar. La forma de polvo seco y/o la torta se muele típicamente en una forma de polvo. Una composición de acuerdo con la invención, toma por lo tanto preferentemente la forma de partículas de libre flotación. Típicamente, la composición es sustancialmente amorfa, o amorfa.
- 10 Típicamente, cuando la composición se analiza por calorimetría de exploración diferencial (DSC), no se observa ninguna endotérmica de fusión cristalina. Por lo tanto, cuando la composición se analiza por DSC, la composición no tiene preferentemente ninguna endotérmica de fusión cristalina, teniendo típicamente las endotérmicas de fusión una entalpía endotérmica de fusión de 1 J/g o más, en el intervalo de temperaturas de 50 a 250 °C, preferentemente de 100 a 200 °C. El análisis de DSC se lleva a cabo como se describe en el Ejemplo 8 posterior. La temperatura específica a la que están ausentes endotérmicas de fusión cristalina dependerá de los componentes presentes en la composición. Por ejemplo, cuando la composición comprende manitol, no hay preferentemente ninguna endotérmica de fusión cristalina en el intervalo de 150 a 180 °C, ya que debería observarse típicamente una fusión endotérmica de manitol a 166 °C.
- 15
- 20 Típicamente, cuando la composición se analiza por calorimetría de exploración diferencial (DSC), no se observan exotérmicas de recristalización. Por lo tanto, cuando la composición se analiza por DSC, la composición preferentemente no tiene ninguna exotérmica de recristalización, típicamente exotérmicas de recristalización que tienen una entalpía endotérmica de fusión de 1 J/g o más, en el intervalo de temperatura de 50 a 150 °C. El análisis de DSC se lleva a cabo como se describe en el Ejemplo 8 posterior. La temperatura específica a la que están ausentes exotérmicas de recristalización dependerá de los componentes presentes en la composición. Por ejemplo, cuando la composición comprende manitol, preferentemente no hay exotérmicas de recristalización en el intervalo de 50 a 120 °C.
- 25

30 La composición de la invención es preferentemente una torta sólida, liofilizada, que toma más preferentemente la forma de partículas de libre flotación.

Por ejemplo, la composición de la invención puede ser:

- 35 • una composición sólida comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y uno o más azúcares y que incorpora un polipéptido, preferentemente dentro de una matriz formada por el azúcar, y en el que cuando la composición se analiza por calorimetría de exploración diferencial (DSC), no se observan endotérmicas de fusión cristalina y preferentemente no se observan exotérmicas de recristalización;
 - 40 • una composición liofilizada que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y uno o más azúcares y que incorpora un polipéptido, preferentemente dentro una matriz formada por el azúcar, y en la que cuando la composición se analiza por calorimetría de exploración diferencial (DSC), no se observan endotérmicas de fusión cristalina y preferentemente no se observan exotérmicas de recristalización;
 - 45 • una torta de liofilización sólida que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y uno o más azúcares y que incorpora un polipéptido, preferentemente dentro de una matriz formada por el azúcar, y en la que cuando la composición se analiza por calorimetría de exploración diferencial (DSC), no se observan endotérmicas de fusión cristalina y preferentemente no se observan exotérmicas de recristalización.
- 50 La composición sólida se proporciona típicamente como un polvo en un vial sellado, una ampolla o una jeringa. Si es para inhalación, el polvo puede proporcionarse en un inhalador de polvo seco. La matriz sólida puede como alternativa proporcionarse como un parche. Un polvo puede comprimirse en una forma de comprimido.

55 La composición puede consistir típicamente, o consistir esencialmente, en polipéptido, un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo, y uno o más azúcares.

Medición de la conservación polipeptídica

- 60 La conservación en relación con un polipéptido tal como una hormona, un factor de crecimiento, un péptido o una citocina se refiere a resistencia del polipéptido a la degradación física o química, agregación y/o pérdida de actividad biológica tal como la capacidad de estimular el crecimiento celular, la proliferación celular o la diferenciación celular, la capacidad de estimular las rutas de señalización celular, unirse con receptores de hormonas o conservar epítopos para unión a anticuerpo, con exposición a condiciones de desecación, congelación, temperaturas por debajo de 0 °C, por debajo de -5 °C, por debajo de -10 °C, por debajo de -15 °C, por debajo de -20 °C o por debajo de -25 °C, liofilización, temperatura ambiente, temperaturas por encima de -10 °C, por encima de -5 °C, por encima de 0 °C, por
- 65

encima de 5 °C, por encima de 10 °C, por encima de 15 °C, por encima de 20 °C, por encima de 25 °C o por encima de 30 °C. La conservación de un polipéptido puede medirse de varias maneras diferentes. Por ejemplo la estabilidad física de un polipéptido puede medirse usando medios de detección de la agregación, precipitación y/o desnaturalización, como se determina, por ejemplo tras el examen visual de la turbidez o del color y/o la claridad como se mide por dispersión de luz ultravioleta o mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

La evaluación de la conservación de la actividad biológica del polipéptido dependerá del tipo de actividad biológica que se evalúe. Por ejemplo, la capacidad de un factor de crecimiento para estimular la proliferación celular puede evaluarse usando varias técnicas diferentes bien conocidas en este campo (tales como ensayos de cultivo celular que supervisan células en fase S, o la incorporación de análogos de bases (por ejemplo, bromodesoxiuridina (BrdU)) como una indicación de cambios en la proliferación celular. Pueden supervisarse diversos aspectos de la proliferación celular, o diferenciación celular usando técnicas tales como inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, inmunohistoquímica.

La evaluación de la conservación de epítomos y formación de complejos de anticuerpo-polipéptido pueden determinarse usando un inmunoensayo, por ejemplo un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Usos de los polipéptidos conservados de la invención

La forma amorfa del polipéptido conservado permite que el polipéptido se almacene durante periodos prolongados de tiempo y maximice el periodo de almacenamiento del polipéptido. La potencia y eficacia del polipéptido se mantienen. El uso particular para el que se emplea un polipéptido conservado de acuerdo con la presente invención depende de la naturaleza del polipéptido. Típicamente, sin embargo, se reconstituye una solución acuosa del polipéptido a partir de la matriz sólida amorfa seca que incorpora el polipéptido antes del uso del polipéptido.

En el caso de un polipéptido terapéutico tal como una hormona, un factor de crecimiento, un péptido o una citocina, una solución acuosa del polipéptido puede reconstituirse mediante la adición de, por ejemplo, agua estéril para inyecciones o solución salina tamponada con fosfato a un polvo seco que comprende el polipéptido conservado. La solución del polipéptido puede después administrarse a un paciente de acuerdo con las técnicas convencionales. La administración puede ser por cualquier modo apropiado, incluyendo por vía parenteral, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía transdérmica, mediante la vía pulmonar, o también, de forma apropiada por infusión directa con un catéter. La dosificación y frecuencia de administración dependerán de la edad, el sexo y la condición del paciente, la administración simultánea de otros fármacos, contraindicaciones y otros parámetros para tener en cuenta por el especialista clínico.

En general, un polipéptido terapéutico conservado de acuerdo con la invención se utiliza en forma purificada junto con vehículos farmacológicamente apropiados. Típicamente, estos vehículos incluyen soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y/o medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico y Ringer con lactato. Los adyuvantes fisiológicamente aceptables adecuados, si es necesario mantener un complejo polipeptídico en suspensión, pueden seleccionarse de espesantes tales como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores de fluidos y nutrientes y reforzadores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes.

Otros polipéptidos conservados de acuerdo con la invención pueden usarse, como se ha observado anteriormente, como agentes de diagnóstico.

Medición de la conservación de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno

La conservación en relación a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se refiere a la resistencia del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a la degradación física o química y/o pérdida de actividad biológica tal como agregación o degradación de proteínas, pérdida de capacidad de unión a antígeno, pérdida de capacidad de neutralizar dianas, estimular una respuesta inmunitaria, estimular células efectoras o activar la ruta del complemento, con exposición a condiciones de desecación, congelación, temperaturas por debajo de 0 °C, por debajo de -5 °C, por debajo de -10 °C, por debajo de -15 °C, por debajo de -20 °C o por debajo de -25 °C, liofilización, temperatura ambiente, temperaturas por encima de -10 °C, por encima de -5 °C, por encima de 0 °C, por encima de 5 °C, por encima de 10 °C, por encima de 15 °C, por encima de 20 °C, por encima de 25 °C o por encima de 30 °C.

La conservación de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede medirse de varias maneras diferentes.

Por ejemplo, la estabilidad física de anticuerpos puede medirse usando medios de detección de agregación, precipitación y/o desnaturalización, como se determina, por ejemplo, tras el examen visual de la turbidez y/o claridad como se mide por dispersión de la luz o por cromatografía de exclusión por tamaño.

La estabilidad química de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno puede evaluarse detectando y cuantificando formas químicamente alteradas del anticuerpo o el fragmento. Por ejemplo pueden evaluarse cambios en el tamaño del anticuerpo o fragmento usando cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y/o espectrometría de masas de desorción e ionización por láser asistida por matriz/tiempo de vuelo (MALDI/TOF MS). Pueden evaluarse otros tipos de alteración química incluyendo alteración de carga, usando técnicas conocidas en este campo, por ejemplo, por cromatografía de intercambio iónico o isoelectro-enfoque.

La conservación de la actividad biológica del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno también puede evaluarse midiendo la capacidad del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, por ejemplo, para unirse con antígeno, inducir una respuesta inmunitaria, neutralizar una diana (por ejemplo un patógeno), estimular las funciones efectoras (por ejemplo, opsonización, fagocitosis, desgranulación, liberación de citocinas o citotoxinas) o activar la ruta del complemento. Se conocen bien en este campo técnicas adecuadas para medir dichas funciones biológicas. Por ejemplo, puede usarse un modelo animal para ensayar funciones biológicas de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Puede usarse un ensayo de unión a antígeno tal como un inmunoensayo, por ejemplo para detectar la capacidad de unión a antígeno.

La determinación si el anticuerpo se une con un antígeno en una muestra puede realizarse por cualquier método conocido en este campo para detectar la unión entre dos restos proteicos. La unión puede determinarse midiendo una característica en el anticuerpo o antígeno que cambia cuando se produce unión, tal como un cambio espectroscópico. La capacidad de un anticuerpo conservado o fragmento de unión a antígeno para unirse con un antígeno puede compararse con un anticuerpo de referencia (por ejemplo, un anticuerpo con la misma especificidad que el anticuerpo conservado o fragmento de unión a antígeno, que no se ha conservado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento).

En general el método para detectar la unión de anticuerpo-antígeno se lleva a cabo en una solución acuosa. En realizaciones particulares, el anticuerpo o antígeno se inmoviliza en un soporte sólido. Típicamente, dicho soporte es una superficie del recipiente en el que se lleva a cabo el método, tal como la superficie de un pocillo de una placa de microtitulación. En otras realizaciones, el soporte puede ser una lámina (por ejemplo una lámina de nitrocelulosa o nailon) o una perla (por ejemplo Sepharose o látex).

En una realización preferida, la muestra de anticuerpo conservada se inmoviliza en un soporte sólido (tal como los soportes analizados anteriormente). Cuando el soporte se pone en contacto con el antígeno, el anticuerpo puede unirse con y formar un complejo con el antígeno. Opcionalmente, la superficie del soporte sólido se lava después para retirar cualquier antígeno que no esté unido con el anticuerpo. La presencia del antígeno unido al soporte sólido (mediante la unión con el anticuerpo) puede después determinarse, lo que indica que el anticuerpo está unido al antígeno. Esto puede realizarse por ejemplo poniendo en contacto el soporte sólido (que puede tener o no antígeno unido a él) con un agente que se une con el antígeno específicamente.

Típicamente el agente es un segundo anticuerpo que es capaz de unirse con el antígeno de una manera específica mientras que el antígeno se une con el primer anticuerpo de muestra inmovilizada que también se une con el antígeno. El anticuerpo secundario puede marcarse directa o indirectamente por un marcador detectable. El anticuerpo secundario puede marcarse indirectamente poniendo en contacto con un tercer anticuerpo específico para la región Fc del segundo anticuerpo, en el que el tercer anticuerpo porta un marcador detectable.

Los ejemplos de marcadores detectables incluyen enzimas, tales como una peroxidasa (por ejemplo de rábano rusticano), fosfatasa, elementos radiactivos, oro (u otro metal coloidal) o marcadores fluorescentes. Los marcadores enzimáticos pueden detectarse usando un sistema basado en quimioluminiscencia o cromogénico.

En una realización separada, el antígeno se inmoviliza en un soporte sólido y el anticuerpo conservado se pone en contacto después con el antígeno inmovilizado. Los complejos de antígeno-anticuerpo pueden medirse usando un anticuerpo secundario capaz de unirse con antígeno o el anticuerpo inmovilizado.

Pueden usarse en inmunoensayos heterogéneos (que requieren una etapa de retirada del anticuerpo o antígeno no unidos) o inmunoensayos homogéneos (que no requieren esta etapa) para medir la capacidad del anticuerpo conservado o fragmentos de unión a antígeno para unirse con el antígeno. En un ensayo homogéneo, a diferencia de un ensayo heterogéneo, la interacción de unión del anticuerpo candidato con un antígeno puede analizarse después de añadirse todos los componentes del ensayo sin requerirse manipulaciones de fluido adicionales. Los ejemplos incluyen transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (TERF) y Exploración Alfa. Pueden usarse inmunoensayos heterogéneos competitivos o no competitivos. Por ejemplo, en un inmunoensayo competitivo, el anticuerpo conservado no marcado en una muestra de ensayo puede medirse por su capacidad para competir con el anticuerpo marcado de capacidad de unión a antígeno conocida (una muestra de control, por ejemplo un anticuerpo muestreado antes de la desecación, tratamiento por calor, liofilización y/o almacenamiento). Ambos anticuerpos compiten por la unión con una cantidad limitada de antígeno. La capacidad de anticuerpo no marcado para unirse con el antígeno está inversamente relacionada con la cantidad de marcador medida. Si un anticuerpo en una muestra es capaz de inhibir la unión entre un anticuerpo de referencia y un antígeno, esto indica entonces que dicho anticuerpo es capaz de unirse con el antígeno.

Los ensayos particulares adecuados para medir la capacidad de unión a antígeno de los anticuerpos conservados de la invención incluyen inmunoensayos ligados a enzima tales como Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA), ensayos de unión homogénea tales como transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (TERF), Inmunoensayo de Polarización de Fluorescencia (IAPF), Inmunoensayo Enzimático de Micropartículas (IEEM), Inmunoensayo Magnético de Quimioluminiscencia (IAMQ), resonancia de plasmón superficial de exploración alfa (RPS) y otros ensayos proteicos o celulares conocidos por los expertos en la materia para ensayar interacciones de anticuerpo-antígeno.

En una realización, usando el ensayo de ELISA, se pone en contacto un antígeno con un soporte sólido (por ejemplo una placa de microtitulación) cuya superficie se ha recubierto con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno conservado de acuerdo con la presente invención (o un anticuerpo de referencia, por ejemplo uno que no se ha conservado de acuerdo con el método de la invención). Opcionalmente, la placa se lava después con tampón para retirar anticuerpo unido de forma no específica. Se aplica un anticuerpo secundario que es capaz de unirse con el antígeno a la placa y, opcionalmente, seguido de otro lavado. El anticuerpo secundario puede unirse directa o indirectamente con un marcador detectable. Por ejemplo, el anticuerpo secundario puede unirse con una enzima, por ejemplo peroxidasa de rábano rústico o fosfatasa alcalina, que produce un producto colorimétrico cuando se proporcionan sustratos apropiados.

En una realización separada, el soporte sólido se recubre con el antígeno y el anticuerpo conservado o fragmento de unión a antígeno se pone en contacto con el antígeno inmovilizado. Puede usarse un anticuerpo específico para el antígeno como anticuerpo conservado para detectar complejos de antígeno-anticuerpo.

En una realización adicional, la interacción de unión del anticuerpo conservado y una diana se analiza usando Resonancia de Plasmón Superficial (RPS). La RPS o el Análisis de Interacción Biomolecular (AIB) detecta interacciones biospecíficas en tiempo real sin marcar ninguno de los interactuantes. Los cambios en la masa en la superficie de unión (indicativa de un acontecimiento de unión) de la microplaca de AIB dan como resultado alteraciones del índice refractario de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de resonancia de plasmón superficial (RPS)). Los cambios en la refractividad generan una señal detectable, que se mide como una indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

La información de RPS puede usarse para proporcionar una medida precisa y cuantitativa de la constante de disociación en equilibrio (D_D), y parámetros cinéticos, incluyendo K_{on} y K_{off} para la unión de una biomolécula con una diana.

Típicamente, la capacidad de un anticuerpo para formar complejos de anticuerpo-antígeno después de conservación de acuerdo con el presente documento e incubación del producto resultante a 37 °C durante 7 días es de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % de la capacidad del anticuerpo para formar dichos complejos antes de dicha incubación, o de hecho antes de conservación de acuerdo con la presente invención y dicha incubación.

Uso de anticuerpos conservados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos

Pueden emplearse anticuerpos conservados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos en aplicaciones terapéuticas y profilácticas *in vivo*, aplicaciones de diagnóstico *in vitro* e *in vivo* y en aplicaciones de ensayo y reactivo *in vitro*.

En aplicaciones de diagnóstico, pueden ensayarse fluidos corporales tales como sangre, orina, saliva, esputo, jugos gástricos, otros componentes de líquidos de la sangre, orina o saliva, o tejido corporal, con respecto a la presencia y cantidad de antígeno que se une con los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno conservados. El ensayo puede realizarse por varios métodos rutinarios conocidos en la técnica tales como inmunoensayos (por ejemplo, RIA, ELISA).

Por ejemplo, una muestra de fluido corporal puede añadirse a una mezcla de ensayo que contiene el anticuerpo y un sistema de marcador para detección de anticuerpo unido a antígeno. Comparando los resultados obtenidos usando una muestra de ensayo con los obtenidos usando una muestra de control, puede determinarse la presencia de un antígeno específico para una enfermedad o afección particular. Pueden usarse dichos métodos para determinar de forma cualitativa o cuantitativa el antígeno asociado con una enfermedad o afección particular en el diagnóstico de esa enfermedad o afección.

Otras técnicas pueden usarse en aplicaciones de diagnóstico tales como análisis de Western y detección de proteínas *in situ* por procedimientos inmunohistoquímicos convencionales, en las que el anticuerpo conservado o fragmento de unión a antígeno puede marcarse según sea apropiado para la técnica particular usada. También pueden usarse anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno conservados en procedimientos de cromatografía de afinidad cuando forman complejo con un soporte cromatográfico, tal como una resina.

Las aplicaciones de diagnóstico incluyen ensayos clínicos humanos en hospitales, consultas médicas y clínicas,

laboratorios de referencia comerciales, bancos de sangre y en casa. Las aplicaciones de diagnóstico no humanas se incluyen en ensayos alimentarios, ensayos de agua, ensayos ambientales, biodefensa, ensayos veterinarios y en biosensores.

5 También pueden usarse anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno conservados en aplicaciones de investigación tales como en desarrollo de fármacos, investigación básica e investigación académica. Más habitualmente, los anticuerpos se usan en aplicaciones de investigación para identificar y localizar proteínas intracelulares y extracelulares. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno conservados descritos en el presente documento pueden usarse en técnicas de laboratorio comunes tales como citometría de flujo, inmunoprecipitación, transferencias de Western, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, ELISA o ELISPOT.

15 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno conservados para uso en aplicaciones de diagnóstico, terapéuticas o de investigación pueden almacenarse en un soporte sólido. En aplicaciones de diagnóstico, por ejemplo, una muestra de paciente tal como un fluido corporal (sangre, orina, saliva, esputo, jugos gástricos, etc.) puede conservarse de acuerdo con los métodos descritos en la presente invención secando una mezcla que comprende la muestra de paciente y mezcla de conservación de la presente invención en un soporte sólido (por ejemplo, una placa de microtitulación, lámina o perla). Después pueden ensayarse muestras de pacientes conservadas (por ejemplo, suero) con respecto a la presencia de anticuerpos en la muestra usando, por ejemplo, inmunoensayos tales como ELISA.

20 Como alternativa, pueden conservarse anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de interés de acuerdo con los métodos descritos en la presente invención secando una mezcla que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y mezcla de conservación de la presente invención en un soporte sólido. Las muestras de pacientes pueden ensayarse con respecto a la presencia de antígenos particulares poniendo en contacto la muestra del paciente con un soporte sólido en el que se unen los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de interés. La formación de complejos de antígeno-anticuerpo puede inducir una señal medible. La presencia y/o cantidad de complejos de antígeno-anticuerpo formados pueden usarse para indicar la presencia de una enfermedad, infección o afección médica o proporcionar un pronóstico.

25 Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno conservados descritos en el presente documento encontrarán uso típicamente en la prevención, supresión o tratamiento de estados inflamatorios, hipersensibilidad alérgica, cáncer, infección bacteriana o vírica y/o trastornos autoinmunitarios (incluyendo, por ejemplo, pero sin limitación, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn y miastenia grave).

30 El anticuerpo puede ser en sí mismo un agente terapéutico o puede dirigir un agente terapéutico u otro resto a un tipo celular, tejido o localización particular. En una realización, los anticuerpos conservados o fragmentos de unión a antígeno de la invención se conjugan con radioisótopos, toxinas, fármacos (por ejemplo fármacos quimioterapéuticos), profármacos enzimáticos o liposomas para el tratamiento de una diversidad de enfermedades o afecciones.

Medición de la conservación enzimática

35 La conservación en relación con una enzima se refiere a la resistencia de la enzima a la degradación física y/o la pérdida de actividad biológica, tal como degradación de proteínas, actividad catalítica reducida, pérdida de capacidad de unirse a un sustrato, producción de productos reducida, eficacia enzimática (por ejemplo, K_{cat}/K_m reducida) o velocidad de reacción, con exposición a condiciones de desecación, congelación, temperaturas por debajo de 0 °C, por debajo de -5 °C, por debajo de -10 °C, por debajo de -15 °C, por debajo de -20 °C o por debajo de -25 °C, liofilización, temperatura ambiente, temperaturas por encima de -10 °C, por encima de -5 °C, por encima de 0 °C, por encima de 5 °C, por encima de 10 °C, por encima de 15 °C, por encima de 20 °C, por encima de 25 °C o por encima de 30 °C. La conservación de una enzima puede medirse de varias maneras diferentes. Por ejemplo la estabilidad física de una enzima puede medirse usando medios de detección de la agregación, precipitación y/o desnaturalización, como se determina, por ejemplo, tras el examen visual de la turbidez o del color y/o la claridad como se mide por dispersión de la luz UV o mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

40 La conservación de la actividad catalítica de la enzima puede evaluarse usando un ensayo enzimático para medir el consumo de sustrato o producción de producto a lo largo del tiempo. La actividad catalítica de una enzima conservada puede compararse con una enzima de referencia que tiene la misma especificidad que no se ha conservado de acuerdo con la presente invención.

45 Pueden usarse cambios en la incorporación de radioisótopos, fluorescencia o quimioluminiscencia de sustratos, productos o cofactores de una reacción enzimática o sustancias unidas a dichos sustratos, productos o cofactores, para supervisar la actividad catalítica de la enzima en dichos ensayos.

50 Por ejemplo, puede usarse un ensayo enzimático continuo (por ejemplo, un ensayo espectrofotométrico, un ensayo fluorométrico, ensayo calorimétrico, ensayo quimioluminiscente o ensayo de dispersión de la luz) o un ensayo

enzimático discontinuo (por ejemplo, un ensayo radiométrico o cromatográfico). A diferencia de ensayos continuos, los ensayos discontinuos implican la toma de muestras de la reacción enzimática a intervalos específicos y medición de la cantidad de producción de producto o consumo de sustrato en estas muestras.

- 5 Por ejemplo, los ensayos espectrofotométricos implican la medición de cambios en la absorbancia de la luz entre productos y reactivos. Dichos ensayos permiten medir la velocidad de reacción continuamente y son adecuados para reacciones enzimáticas que dan como resultado un cambio en la absorbancia de luz. El tipo de ensayo espectrofotométrico dependerá de la reacción de enzima/sustrato particular que se esté supervisando. Por ejemplo, las coenzimas NADH y NADPH absorben luz UV en sus formas reducidas, pero no en sus formas oxidadas. Por lo tanto, una oxidorreductasa que usa NADH como sustrato podría de este modo ensayarse siguiendo la reducción de la absorbancia de UV a medida que consume la coenzima.

- 15 Los ensayos radiométricos implican la incorporación o liberación de radioactividad para medir la cantidad de producto preparado a lo largo del tiempo durante una reacción enzimática (que requiere la retirada y el recuento de muestras). Los ejemplos de isótopos radiactivos adecuados para su uso en estos ensayos incluyen ^{14}C , ^{32}P , ^{35}C y ^{125}I . Pueden usarse técnicas tales como espectrometría de masas para supervisar la incorporación o liberación de isótopos estables a medida que el sustrato se convierte en producto.

- 20 Los ensayos cromatográficos miden la formación de producto separando la mezcla de reacción en sus componentes por cromatografía. Las técnicas adecuadas incluyen cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía de capa fina.

- 25 Los ensayos fluorimétricos usan una diferencia en la fluorescencia de sustrato del producto para medir la reacción enzimática. Por ejemplo una forma reducida puede ser fluorescente y una forma oxidada no fluorescente. En dicha reacción de oxidación, la reacción puede seguirse de una reducción de la fluorescencia. Las reacciones de reducción pueden supervisarse por un aumento de la fluorescencia. También pueden usarse sustratos sintéticos que liberan un colorante fluorescente en una reacción catalizada por enzimas.

- 30 Pueden usarse ensayos quimioluminiscentes para reacciones enzimáticas que implican emisión de luz. Dicha emisión de luz puede usarse para detectar la formación de productos. Por ejemplo, una reacción enzimática que implica la enzima luciferasa implica producción de luz a partir de su sustrato luciferina. Puede detectarse emisión de luz por un aparato sensible a la luz tal como un luminómetro o microscopios ópticos modificados.

Usos de las enzimas conservadas de la invención

- 35 La forma amorfa de la enzima conservada permite que la enzima se almacene durante periodos de tiempo prolongados y maximice el periodo de validez de la enzima. La potencia y eficacia de la enzima se mantienen. El uso particular al que se dedica una enzima conservada de acuerdo con la presente invención depende de la naturaleza de la enzima. Típicamente, sin embargo, una solución acuosa de la enzima se reconstituye a partir de la matriz sólida amorfa seca que incorpora la enzima antes del uso de la enzima.

- 45 En el caso de una enzima terapéutica, por ejemplo, una solución acuosa de la enzima puede reconstituirse mediante la adición de, por ejemplo, agua para inyecciones o solución salina tamponada con fosfato a un polvo seco que comprende la enzima conservada. La solución de la enzima puede entonces administrarse a un paciente de acuerdo con las técnicas convencionales. La administración puede ser por cualquier modo apropiado, incluyendo por vía parenteral, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía transdérmica, mediante la vía pulmonar, o también, de forma apropiada, por infusión directa con un catéter. La dosificación y frecuencia de administración dependerán de la edad, el sexo y la condición del paciente, administración simultánea de otros fármacos, las contraindicaciones y otros parámetros que debe tener en cuenta el especialista clínico.

- 50 En general, una enzima terapéutica conservada de acuerdo con la invención se utiliza en forma purificada junto con vehículos farmacológicamente apropiados. Típicamente, estos vehículos incluyen soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólicas/acuosas, incluyendo cualquier solución salina y/o medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico y Ringer con lactato. Los adyuvantes fisiológicamente aceptables adecuados, si es necesario mantener un complejo polipéptido en suspensión pueden elegirse entre espesantes tales como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores de fluidos y nutrientes y reforzadores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes.

- 60 Otras enzimas conservadas de acuerdo con la invención pueden usarse, como se ha observado anteriormente, como agentes de diagnóstico, en biosensores, en la producción de productos a granel tales como glucosa o fructosa, en el procesamiento de alimentos y análisis de alimentos, en detergentes de lavandería y lavavajillas automáticos, en las industrias textiles, de pulpa, del papel y de piensos animales, como un catalizador en la síntesis de productos químicos finos, en diagnóstico clínico o en aplicaciones de investigación tales como ingeniería genética.

65

Medida de la conservación de inmunógeno de vacuna

La conservación en relación con un inmunógeno de vacuna se refiere a la resistencia del inmunógeno de vacuna a la degradación física o química y/o a la pérdida de actividad biológica tal como degradación proteica, pérdida de capacidad de estimular una respuesta inmunitaria celular o humoral o pérdida de capacidad de estimular la producción de anticuerpos o unirse con anticuerpos en condiciones de desecación, congelación, temperaturas inferior a 0 °C, inferior a -5 °C, inferior a -10 °C, inferior a -15 °C, inferior a -20 °C o inferior a -25 °C, liofilización, temperatura ambiente, temperaturas superior a -10 °C, superior a -5 °C, superior a 0 °C, superior a 5 °C, superior a 10 °C, superior a 15 °C, superior a 20 °C, superior a 25 °C o superior a 30 °C.

La conservación de un inmunógeno de vacuna puede medirse de varias maneras diferentes. Por ejemplo, la antigenicidad puede evaluarse midiendo la capacidad de un inmunógeno de vacuna para unirse con anticuerpos específicos de inmunógeno. Esto puede ensayarse en diversos inmunoensayos conocidos en la técnica, que pueden detectar anticuerpos para el inmunógeno de vacuna. Típicamente un inmunoensayo para anticuerpos implicará seleccionar y preparar la muestra de ensayo, tal como una muestra de inmunógeno de vacuna conservado (o una muestra de referencia de inmunógeno de vacuna que no se ha conservado de acuerdo con los métodos de la presente invención) e incubando después con antisuero específico del inmunógeno en cuestión en condiciones que permiten que se formen complejos de antígeno-anticuerpo.

Además, pueden ensayarse anticuerpos para hemaglutinina de gripe y neuraminidasa de forma rutinaria en los ensayos de inhibición de hemaglutinina e inhibición de neuraminidasa, un ensayo de aglutinación usando eritrocitos o usando el ensayo de difusión radial individual (DRI). El DRI se basa en la formación de una reacción visible entre el antígeno y su anticuerpo homólogo en una matriz de gel de agarosa de soporte. El inmunógeno vírico se incorpora en el gel y se permite que anticuerpos homólogos se difundan radialmente desde puntos de aplicación a través de los inmunógenos fijados. Se producen zonas opalescentes medibles por los complejos antígeno-anticuerpo resultantes.

Usos de inmunógenos de vacuna conservados

Se usa un inmunógeno de vacuna conservado de la presente invención como una vacuna. Por ejemplo, un inmunógeno de vacuna subunitario conservado, inmunógeno de vacuna conjugado o inmunógeno toxoide es adecuado para su uso como una subunidad, un conjugado o una vacuna de toxoide respectivamente. Como una vacuna, los inmunógenos de vacuna conservados de la invención pueden usarse para el tratamiento o la prevención de varias afecciones incluyendo pero sin limitación infección vírica, secuelas de infección vírica incluyendo, pero sin limitación toxicidad inducida por virus, animal o insecto, cáncer y alergias. Dichos antígenos contienen uno o más epítopos que estimularán el sistema inmunitario de un hospedador para generar una respuesta específica de antígeno humoral y/o celular

El inmunógeno de vacuna conservado de la invención puede usarse como una vacuna en la profilaxis o el tratamiento de infección por virus tales como virus del papiloma humano (VPH), VIH, VHS2/VHS1, virus de la gripe (tipos A, B y C) virus paragripal, virus de la polio, virus VSR, rinovirus, rotavirus, virus de la hepatitis A, virus norwalk, enterovirus, astrovirus, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la varicela-zoster, citomegalovirus, virus de epstein-barr, adenovirus, virus de la rubeola, virus del linfoma de linfocitos T humano de tipo I (HTLV-I), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis D, poxvirus y virus vaccinia. La vacuna puede usarse además para proporcionar una respuesta inmunitaria adecuada contra numerosas enfermedades veterinarias, tales como glosopeda (incluyendo los serotipos O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia-1), coronavirus, lengua azul, virus de leucemia felina, gripe aviar, virus hendra y nipah, pestivirus, parvovirus canino y virus de la diarrea vírica bovina. Como alternativa, la vacuna puede usarse para proporcionar una respuesta inmunitaria adecuada contra toxicidad inducida por animales o insectos (por ejemplo inducida por veneno de serpiente u otros venenos animales). En una realización, la vacuna es una vacuna multivalente.

Las composiciones de vacuna de la presente invención comprenden un inmunógeno de vacuna mezclado con la mezcla de conservación de la invención que contiene uno o más azúcares y PEI. La composición de vacuna puede comprender además tampones apropiados y aditivos tales como antibióticos, adyuvantes u otras moléculas que potencian la presentación del inmunógeno de vacuna a células específicas del sistema inmunitario.

Puede usarse una diversidad de adyuvantes bien conocidos en la técnica para aumentar la potencia de la vacuna y/o modular las respuestas inmunitarias humorales y celulares. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero sin limitación, emulsión de aceite en agua que contiene adyuvantes o adyuvantes de agua en aceite, tales como aceite mineral, adyuvantes basados en aluminio, adyuvantes basados en escualeno/fosfato, adyuvante completo/incompleto de Freund, citocinas, un complejo inmunoestimulante (ISCOM) y cualquier otra sustancia que actúe como agentes inmunoestimulantes para potenciar la eficacia de la vacuna. El adyuvante basado en aluminio incluye fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio. Un ISCOM puede comprender colesterol, lípido y/o saponina. El ISCOM puede inducir una amplia serie de respuestas inmunitarias sistémicas.

La composición de vacuna de la presente invención puede estar en forma liofilizada (criodesecada) para

proporcionar almacenamiento apropiado y maximizar el periodo de validez de la preparación. Esto permitirá la acumulación de vacuna durante periodos de tiempo prolongados y ayudará a mantener la inmunogenicidad, potencia y eficacia. La mezcla de conservación de la presente invención es particularmente adecuada para conservar sustancias víricas contra la desecación y tensiones térmicas encontradas durante los protocolos de liofilización/criodesecación. Por lo tanto, la mezcla de conservación es adecuada para añadir al inmunógeno de vacuna poco después de la recogida y antes de someter la muestra al procedimiento de liofilización.

Para medir la conservación de una vacuna preparada de acuerdo con la presente invención, la potencia de la vacuna puede medirse usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, la generación de una respuesta inmunitaria celular o humoral puede ensayarse en un modelo animal apropiado supervisando la generación de anticuerpos o respuestas celulares inmunitarias a la vacuna. La capacidad de las muestras de vacuna preparadas de acuerdo con el método de la presente invención para desencadenar una respuesta inmunitaria puede compararse con vacunas no sometidas a la misma técnica de conservación.

15 Administración

Pueden administrarse polipéptidos conservados de acuerdo con la presente invención, en algunos casos después de reconstitución de un producto seco o liofilizado, a un sujeto *in vivo* usando una diversidad de técnicas y vías conocidas. Por ejemplo, los polipéptidos pueden proporcionarse como una solución, suspensión o emulsión inyectable y administrarse mediante inyección parenteral, subcutánea, oral, epidérmica, intradérmica, intramuscular, interarterial, intraperitoneal, intravenosa usando una jeringa y aguja convencionales, o usando un sistema de inyección a chorro del líquido. Los polipéptidos pueden administrarse por vía tópica a la piel o el tejido mucoso, tal como por vía nasal, por vía intratraqueal, por vía intestinal, por vía sublingual, por vía rectal o por vía vaginal, o proporcionarse como una pulverización finamente dividida adecuada para administración respiratoria o pulmonar.

En una realización, el método de la invención comprende además la etapa de procesar la mezcla en una formulación adecuada para administración como una inyección líquida. Preferentemente, el método comprende además la etapa de procesar la mezcla en una formulación adecuada para administración mediante ingestión o mediante la vía pulmonar.

El producto conservado se administra a un sujeto en una cantidad que es compatible con la formulación de dosificación y que será profiláctica y/o terapéuticamente eficaz. La administración del producto conservado de la invención puede ser para fin "profiláctico" o "terapéutico". Como se usa en el presente documento, el término "terapéutico" o "tratamiento" incluye cualquiera de los siguientes: la prevención de infección o reinfección; la reducción o eliminación de síntomas; y la reducción o eliminación completa de un patógeno. El tratamiento puede efectuarse de forma profiláctica (antes de la infección) o de forma terapéutica (después de la infección).

El compuesto de fórmula (I) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo y/o compuesto de fórmula (II) o sal o éster fisiológicamente aceptable del mismo y, opcionalmente, uno o más azúcares, típicamente actúa como un agente de resuspensión para un producto seco o liofilizado que comprende polipéptidos, preferentemente un producto de la invención, por ejemplo cuando se convierte a forma líquida (solución acuosa) antes de la administración a un paciente.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

45 Materiales y equipamiento

Se emplearon los siguientes materiales, equipamiento y técnicas a no ser que se indique de otro modo:

	<i>Proveedor</i>	<i>Código de Producto</i>	<i>Número de Lote</i>
Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS)	Sigma	D8662	RNBB2193, RNBB4780, RNBB6651
Dimetilglicina (DMG)	Sigma	D1156	077K1856
Dimetilsulfona	Sigma	M81705	0001452516
Manitol	Sigma	M1902	077K0166
Sacarosa	Sigma	16104	SZB90120
Rafinosa	Sigma	R0250	050M0053
Tween 20	Sigma	P1379	087K0197
Leche en polvo desnatada	Marvel	-	-
Cromógeno TMB	Invitrogen	SB02	72764382A
Ácido sulfúrico	Sigma	25,8105	S55134-258
Agua de uso en HPLC	Sigma	34877-2,5 l	BCBG1213V

ES 2 633 897 T3

	<i>Proveedor</i>	<i>Código de Producto</i>	<i>Número de Lote</i>
Sulfato sódico	VWR	28111.296	07G160005
Sulfato potásico	Sigma	71840-1 KG	0001451144
Tampón de acetato	Sigma	31103	SZBB0540
Suero Bovino Fetal	Sigma	F7524	111B77F2311
Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)	Sigma	300-23	5110901099
Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF)	Sigma	130-093-860	RNBB6654
Penicilina estreptomina	Sigma	P4458	030M0695
Medio de cultivo (RPMI)	Sigma	R8758	RNBB8596
Agua	Sigma	W3500	RNBB8005
Sal sódica de sal interna de 2,3-bis [2-metoxi-4-nitro-5 sulfofenil]-2H- tetrazolio-5-carboxianilida (XTT)	Sigma	TOX2	078K8403
β -Mercaptoetanol	Sigma	M7522	01496DK
	<i>Proveedor</i>	<i>Código de Producto</i>	
F(ab') ₂	AbDSerotec	AbD09357.4	
Antígeno-IgG2b kappa	AbDSerotec	PRP05	
HRP de cabra anti humano	AbDSerotec	STAR126P	
HRP de conejo anti ratón	AbDSerotec	STAR13B	
Suero de ratón normal	Sigma	M5905	
Ratón anti <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	AbDSerotec	6600-1205	
Antígeno- <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	AbDSerotec	MPP017X	
IgG de ratón anti <i>Neisseria gonorrhoeae</i> conjugado con HRP	AbDSerotec	6600-1205MX	
Patrones de Tamaño de HPLC-SEC	BioRAD	1901-151	
Fab Monovalente	AbDSerotec	AbD12385.2	
Línea celular M-NFS-60	LGC	CRL-1838	
	<i>Fabricante</i>	<i>Código de producto</i>	
Tubos eppendorf de 2 ml	VWR	16466-058	
	<i>Fabricante</i>		
Congelador a -80 °C Forma Serie 900	Thermofisher		
Liofilizador Virtis	Virtis		
Balanza Atlion ATL-84-1	Acculab		
Nevera a +4 °C Med Line	Liebherr		
Incubadora a + 40 °C	Binder		
Lector de Microplacas HT Synergy	Biotek		
Nevera a +4 °C Med Line	Liebherr		
Nevera a +4 °C LEC 1132880	LEC		
Incubadora de Agitación a +37°C	Max Q 4450		
Módulo de Separación de HPLC	Waters		
Detector de Matriz de Fotodiodo HPLC	Waters		
Horno de Columna de HPLC	Waters		
Columna de Separación de HPLC-SEC (<i>TSK Gel G3000SWxl 7,8mm x 30cm</i>)	Sigma		
Precolumna de HPLC-SEC (<i>SWxl Guardcol 6,0mm Sigma x 4,0 cm</i>)			
Sistema de supervisión de la Temperatura	Kelsius		
Incubadora a 56°C BD115	Binder		
Incubadora de CO ₂ Binder	Binder		

	Proveedor	Código de Producto	Número de Lote
Balanza BP61	Sartorius		
Vórtex G560E	VortexGenie		
Incubadora a 37 °C IP250	LTE		
Baño de Agua JB Aqua 5 VAB05EU	Grant		
Microondas KEN SJ/5538	Kenwood		
Cabinas de Seguridad Microbiológica	Biomat		
Refrigerador de Profilina (almacenamiento de reserva)	Liebherr		
Excipientes Manitol y TMG	HEPES + NaCl 25 mM a pH 7,9 (LBN0014p34)		
rPA	Viales de Liofilización		
Tapones	PBS		
Tween20 Sigma P1379	Leche Marvel		
mAb de <i>Bacillus anthracis</i> Fitzgerald 10R-B106a clon 3	IgG de cabra anti ratón-HRP Sigma A0412		
TMB Invitrogen SB02	H ₂ SO ₄ Sigma 25 810-5		
Placas de Fondo Plano Nunc 439454	Agua		
Viales FD Schott VCDIN2R	Tapón FD de 14 mm Adelphi healthcare W1816		

Sello de Aluminio de 13mm Adelphi healthcare

COTW13

Placas de Fondo Plano Nunc 439454	Tampón de Muestras Biorad 161-0737
Marcador molecular Biorad 161-0319	Marcador de Ejecución Biorad 161-0772
Geles de TGX 4-20 % Biorad 456-1096	Azul brillante de Coomassie Fisher 101-25
Metanol VWR 20486.326	Ácido acético Fisher A/0360/PB08
Glicerol Sigma G9012	Isopropanol VWR 20839.322

Ejemplo 1

- 5 El F(ab')₂ bivalente se expuso térmicamente en presencia de diversas concentraciones de excipientes y se ensayó en diferentes puntos. Se usó un ensayo de ELISA para evaluar la actividad F(ab')₂ residual. Esta se usó como una medida del alcance del daño recibido durante la exposición térmica.

Métodos

- 10 Preparación y exposición térmica de F(ab')₂ bivalente en un entorno sólido con excipientes.

- 15 Se retiró F(ab')₂ bivalente en PBS del almacenamiento a -80 °C y se permitió que se descongelara a temperatura ambiente. Para determinar las propiedades protectoras de los excipientes descritos posteriormente en un entorno sólido, se distribuyeron en alícuotas 300 µl de cada formulación con una concentración de anticuerpo de 6,67 µg/ml en viales de liofilización de vidrio. Los detalles de cada formulación se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1: detalles de formulaciones de excipientes

Abreviatura	Descripción	DMG	manitol
[Hi]DMG/man	DMG [alto], manitol [fijo]	1M	0,5M
[Med]DMG/manitol	DMG [medio], manitol [fijo]	0,7M	0,5M
[Lo]DMG/manitol	DMG [bajo], manitol [fijo]	0,3M	0,5M
-DMG/manitol	sin DMG, manitol [fijo]	-	0,5M
-DMG/-manitol	sin DMG/sin manitol, solamente PBS	-	-

Se prepararon diez viales de cada formulación para evaluar cinco puntos temporales por duplicado.

- 20 Las muestras se liofilizaron después usando un liofilizador VirTis Advantage en la receta 6, usando los ciclos de secado mostrados en la Tabla 2 posterior. Las muestras se congelaron a -40 °C durante 45 minutos antes de aplicarse un vacío, inicialmente a 200 milliTorre. Se ajustaron la temperatura de almacenamiento y el vacío a lo largo del proceso.
- 25 En la fase de secado primaria, la temperatura de almacenamiento se redujo inicialmente a -40 °C. La fase de secado secundaria incluyó una serie de etapas de mantenimiento en las que aumentaba la temperatura hasta 30 °C hasta

que se completó el secado. Las sondas registraron temperaturas de almacenamiento y temperaturas de condensador.

Tabla 2

Etapa	Temperatura de almacenamiento (°C)	Tiempo (minutos)	Variación/ Mantenimiento	Vacío (milliTorre)
1	-45	15	H	200
2	-36	600	H	300
3	-20	120	R	300
4	-10	120	R	300
5	0	120	R	300
6	10	120	R	80
7	20	120	R	80
8	30	1255	R	80
9	4	1255	R	80

5 Una vez liofilizados, los viales se fotografiaron para documentar la calidad de las tortas producidas, después se pusieron en un incubador a +40 °C para comenzar la exposición térmica.

10 *Ensayo de la actividad de F(ab')₂ bivalente*

Se ensayó la actividad del F(ab')₂ bivalente mediante ELISA. Se usó antígeno (IgG2b-kappa de rata) diluido hasta 0,5 µg/ml en PBS para recubrir 100 µl/pocillo de la fila A a la G de una placa de ELISA de 96 pocillos, así como dos pocillos extra en la fila H para la condición de control de +4 °C. Estos controles se usaron para normalizar los datos posteriormente. Las placas se incubaron durante 18 horas a +4 °C y después se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween 20 0,05 % (tampón de lavado). Las placas se secaron por absorción a una toalla de papel. Este método de absorción se usó en cada etapa de lavado. Las placas se bloquearon durante 1,5 horas con PBS que contenía leche desnatada en polvo 5 % y Tween 20 0,05 %. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado antes de añadir las muestras.

20 Después de incubación en exposición térmica, las formulaciones de F(ab')₂ se retiraron del incubador y se reconstituyeron en 1 ml de tampón de lavado. Esto dio como resultado la concentración de anticuerpo requerida para el ELISA (2 µg/ml). Cada muestra diluida se añadió a la placa por duplicado y se diluyó 2 veces por la placa (las concentraciones finales variaron de 2 µg/ml a 0,0625 µg/ml). También se incluyó una condición sin F(ab')₂ bivalente para medir la señal de fondo. La condición de control positivo se ensayó a 2 µg/ml. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1,5 horas después de lo cual las placas se lavaron cinco veces con tampón de lavado.

30 Se diluyó un anticuerpo de cabra conjugado con HRP antihumano 1:5.000 en tampón de lavado y se añadieron 100 µl a todos los pocillos que contenían F(ab')₂ bivalente. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1,5 horas y después se lavaron cinco veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 µl de cromógeno estabilizado por TMB a cada pocillo y se permitió que reaccionara durante 10 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual se añadieron 100 µl de ácido sulfúrico 200 mM para detener la reacción. Las placas se leyeron a 450 nm usando lector de microplacas Synergy HT.

35 *Análisis estadístico*

El promedio y el error típico se tomaron para cada duplicado y los puntos de datos se representaron como una gráfica de barras a una concentración de F(ab')₂ designada.

40 Los resultados se normalizaron con respecto al control positivo F(ab')₂ bivalente (una muestra tomada de la alícuota de reserva que no se había mezclado con excipientes o no se había sometido a exposición térmica). Los resultados se dividieron por el promedio de los dos pocillos de control positivo para la placa (cada placa tuvo un control positivo separado).

45 Se llevó a cabo una prueba de t de Student en el punto temporal de 9 meses para determinar la significación entre las muestras liofilizadas y almacenadas con excipientes y las liofilizadas y almacenadas solamente con PBS. Los P valores para formulaciones sometidas a prueba de T frente a muestras con solamente PBS a los 9 meses (n = 4, prueba de t de student de dos colas) se exponen en la Tabla 3.

Tabla 3

Formulaciones sometidas a prueba de T frente a muestra solamente de PBS	P valor
HiDMG	0,000127319
MedDMG	0,12493135
LoDMG	0,000587714

Resultados

- 5 *Actividad de fragmentos F(ab')₂ bivalentes después de tratamiento térmico a +56 °C durante 24 horas en un entorno líquido.*

En un estudio preliminar, se almacenó F(ab')₂ de reserva (proporcionado por AbD Serotec - concentración 0,73 mg/ml) a +56 °C para evaluar la estabilidad inicial a temperaturas elevadas. Se descubrió que el anticuerpo era extremadamente termolábil, permaneciendo poca actividad después de 24 horas a 56 °C, lo que proporciona un excelente punto de partida para ensayar la capacidad de los excipientes para estabilizar este anticuerpo. Los resultados se representan en la Figura 1, donde ET indica exposición térmica (datos no normalizados) y las barras de error son la desviación típica, n=2.

- 15 *Actividad de fragmentos F(ab')₂ bivalentes después de tratamiento térmico a +40 °C con y sin excipientes en un entorno sólido.*

El F(ab')₂ bivalente se sometió a exposición térmica en presencia de diversas concentraciones de los excipientes y se ensayó en diferentes puntos temporales (1, 2, 3, 6 y 9 meses). Después de 1 mes de almacenamiento a +40 °C, el grupo de DMG 1 M tuvo una mayor actividad que todos los otros grupos. Después de 2 meses de almacenamiento a +40 °C, la actividad descendió en todos los grupos. Parecería que la mayoría del daño sucede durante los primer y segundo meses de exposición térmica. Las muestras que contienen [Hi]DMG/man conservaron la mayor actividad de anticuerpos después de 9 meses de almacenamiento con una densidad óptica (DO) de 0,20. Todas las otras muestras que contienen DMG tuvieron una DO de aproximadamente de 0,15, mientras que los controles de solamente manitol y PBS fueron de aproximadamente de 0,10 (véase la Figura 2).

Conclusión

Puede verse en la Figura 1 que el F(ab')₂ bivalente es extremadamente termolábil. Cuando el F(ab')₂ bivalente se ha liofilizado (con o sin excipientes), la actividad del anticuerpo se conserva durante significativamente más tiempo durante la exposición térmica. Aunque todas las muestras conservan la actividad de anticuerpo en algún grado, las que contienen DMG y manitol en combinación conservan más actividad de anticuerpo que las que no. Las muestras que contienen DMG 1 M con manitol protegen el F(ab')₂ bivalente ligeramente mejor que las que tienen 0,7 M o 0,3 M (Figura 2).

El análisis estadístico en la Tabla 3 anterior muestra que las diferencias entre la antigenicidad conservada en las muestras liofilizadas con [HiDMG] y [LoDMG] y muestras liofilizadas con PBS solamente a los 9 meses son estadísticamente significativas.

40 Ejemplo 2

El anticuerpo monoclonal (mAb) IgG de ratón anti *Neisseria gonorrhoeae* conjugado con HRP se sometió a exposición térmica a +40 °C en presencia y ausencia de diversas concentraciones de excipientes a los dos meses. Se usó un ensayo de ELISA para evaluar la actividad de unión de mAb conjugado con HRP residual. Esta se usó como una medida del grado de daño recibido/protección conseguida, es decir cuanto mayor sea la actividad de unión del anticuerpo, mayor será la protección obtenida.

Métodos

- 50 *Preparación y exposición térmica de anticuerpo monoclonal IgG de ratón conjugado con HRP anti Neisseria gonorrhoeae en un entorno sólido con excipientes.*

Para determinar las propiedades protectoras de los excipientes descritos posteriormente en un entorno sólido, se distribuyeron en alícuotas 300 µl de cada formulación con una concentración de anticuerpo de 167 µg/ml en viales de liofilización de vidrio y se liofilizaron usando el programa 1 en un liofilizador Virtis como se describe posteriormente. Se exponen detalles de cada formulación en la Tabla 4. Cada formulación se preparó para evaluar la actividad de unión residual a los 2 meses a +40 °C, por duplicado.

Tabla 4: detalles de formulaciones de excipientes

Abreviatura	Descripción	DMG	manitol
HiDMG/manitol	[DMG] Alto, [manitol] fijo en PBS	1 M	0,5 M
LoDMG/manitol	[DMG] Bajo, [manitol] fijo en PBS	0,7 M	0,5 M
Man solamente	[manitol] fijo solamente en PBS	-	0,5 M
PBS solamente	PBS solamente	-	-

5 Las muestras se liofilizaron después usando un liofilizador VirTis Advantage, usando los ciclos de secado mostrados en la Tabla 5 posterior. Las muestras se congelaron a -40 °C durante 120 minutos antes de aplicarse un vacío, inicialmente a 100 milliTorre. La temperatura de almacenamiento y vacío se ajustaron a lo largo del proceso.

10 En la fase de secado primaria la temperatura de almacenamiento se redujo inicialmente a -45 °C. La fase de secado secundaria incluyó una serie de etapas de mantenimiento en las que se aumentaba la temperatura hasta 30 °C hasta que se completó el secado. Las sondas registraron temperaturas de almacenamiento y temperaturas de condensador.

Tabla 5

Etapas	Temperatura de almacenamiento (°C)	Tiempo (minutos)	Variación / Mantenimiento	Vacío (milliTorre)
1	-45	15	H	100
2	-38	30	R	100
3	-34	1200	H	100
4	-34	1200	H	100
5	-20	120	H	100
6	-10	120	H	100
7	0	120	H	100
8	10	120	H	80
9	20	120	H	80
10	30	1255	H	80
11	4	1255	H	80
12	4	1255	H	80
13	4	1255	H	80
14	4	1255	H	80

15 Una vez liofilizados, los viales se colocaron en una incubadora a +40 °C para comenzar la exposición térmica.

Ensayo de actividad de IgG de ratón anti Neisseria gonorrhoeae conjugado con HRP

20 La actividad del IgG de ratón anti *Neisseria gonorrhoeae* conjugado con HRP se ensayó mediante ELISA. Se retiró el antígeno (*Neisseria gonorrhoeae*) de -80 °C y se permitió que se descongelara a temperatura ambiente. Se diluyó hasta 1,5 µg/ml en PBS y se recubrieron pocillos de placas de ELISA en las filas A-G con 100 µl, junto con dos pocillos en la fila H que actuaron como un control positivo. Las placas se incubaron durante 18 horas a +4 °C y después se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween 20 a 0,05 % (tampón de lavado). Las placas se secaron por absorción con una toalla de papel. Este método de absorción se usó en cada etapa de lavado. Las placas se bloquearon durante 1,5 horas con PBS que contenía leche desnatada en polvo 5 % y Tween 20 0,05 % (tampón de bloqueo), a +37 °C con agitación. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado antes de añadir las muestras.

30 Después de incubación en exposición térmica, las formulaciones de mAb se retiraron del incubador y se reconstituyeron en 300 µl de PBS, y después se diluyeron hasta 2 µg/ml en tampón de bloqueo. Esto dio como resultado la concentración de anticuerpo requerida para el ELISA (2 µg/ml). Cada muestra diluida se añadió a la placa por duplicado y se diluyó 2 veces por la placa (las concentraciones finales variaron de 2 µg/ml a 0,0625 µg/ml). El volumen final en cada pocillo fue de 100 µl.

También se incluyó una condición sin mAb (solamente con tampón de bloqueo) para medir la señal de fondo. Las placas se incubaron a +37 °C con agitación durante 1,5 horas después de lo cual las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 µl de cromógeno estabilizado por TMB a cada pocillo y se permitió que reaccionara durante 20 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual se añadieron 100 µl de ácido sulfúrico 200 mM para detener la reacción. Las placas se leyeron a 450 nm usando un lector de microplacas Synergy HT.

Análisis Estadístico

El promedio y el error típico se tomaron para cada duplicado y los puntos de datos se representaron como una gráfica lineal o como una gráfica de barras a una concentración de mAb designada.

Los resultados se normalizaron con el control positivo (una muestra obtenida de la alícuota de reserva que no tenía ninguna adición de excipientes o exposición térmica). Cada resultado se dividió por el promedio de los dos pocillos de control positivos para la placa (cada placa tuvo un control positivo separado).

Resultados

Actividad de IgG de ratón anti Neisseria gonorrhoeae después de tratamiento térmico a +56 °C durante 7 días en un entorno liofilizado y líquido.

Se llevó a cabo un estudio preliminar usando el IgG de ratón no conjugado anti *Neisseria gonorrhoeae* para determinar la estabilidad inicial del anticuerpo a una temperatura elevada. El mAb se liofilizó con una formulación básica (solamente PBS, 30 µg/ml de concentración de anticuerpo) y se almacenó a +56 °C. También se colocó un control idéntico, pero no liofilizado, a +56 °C. Los resultados se muestran en la Figura 3 (datos no normalizados, las barras de error son desviación típica, n=2). Se descubrió que el anticuerpo era extremadamente termolábil con poca actividad restante después de 7 días a +56 °C en un entorno líquido, y aproximadamente un tercio de pérdida de actividad en la situación liofilizada. Esto proporcionó un punto de partida excelente para ensayar la capacidad de los excipientes para estabilizar este anticuerpo.

Actividad de IgG de ratón anti Neisseria gonorrhoeae conjugado con HRP después de tratamiento térmico a +40 °C con y sin excipientes en un entorno sólido.

El mAb conjugado con HRP se sometió a exposición térmica en presencia de diversas combinaciones y concentraciones de excipientes y se ensayó después de 2 meses a +40 °C. La Figura 4 muestra datos en el punto temporal de 2 meses (las barras de error son error típico, n=2).

En el punto temporal final de 2 meses, las muestras que contenían DMG y manitol mantuvieron mayor actividad de unión del anticuerpo que las muestras que contenían solamente PBS y solamente manitol. Las muestras que contenían PBS y solamente manitol mantuvieron aproximadamente 25 % de la mejor combinación de DMG y manitol.

Conclusión

Después de la exposición térmica, DMG tiene un beneficio cuando se añade a manitol para conservar la actividad de unión del IgG de ratón anti *Neisseria gonorrhoeae* conjugado con HRP.

Ejemplo 3

F(ab')₂ bivalente se sometió a exposición térmica en presencia de diversas concentraciones de excipientes y se ensayó en diferentes puntos. Se usó un ensayo de ELISA para evaluar la actividad F(ab')₂ residual. Esta se usó como una medida del grado de daño recibido.

Métodos

Preparación y exposición térmica de F(ab')₂ bivalente en un entorno sólido con excipientes

Para determinar las propiedades protectoras de los excipientes descritos posteriormente en un entorno sólido, se distribuyeron en alícuotas 300 µl de cada formulación con una concentración de anticuerpo de 6,7 µg/ml en viales de liofilización de vidrio y se liofilizaron usando el programa 1 en un liofilizador Virtis como se describe en el Ejemplo 2. Los detalles de cada formulación se exponen en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6: detalles de formulaciones de excipientes

Abreviatura	Descripción	Sac/Raf (SR)	DMG (D)	MSM (M)
---	PBS solamente	-	-	-
S--	SR, sin DMG, sin MSM	0,1 M, 0,01 M	-	-
S-L	SR, sin DMG, LoMSM	0,1 M, 0,01 M	-	0,1 M
S-H	SR sin DMG, HiMSM	0,1 M, 0,01 M	-	1 M
SL-	SR LoDMG, sin MSM	0,1 M, 0,01 M	0,1 M	-
SLL	SR, LoDMG, LoMSM	0,1 M, 0,01 M	0,1 M	0,1 M
SLH	SR, LoDMG, HiMSM	0,1 M, 0,01 M	0,1 M	1 M
SH-	SR, HiDMG, sin MSM	0,1 M, 0,01 M	1 M	-
SHL	SR, HiDMG, LoMSM	0,1 M, 0,01 M	1 M	0,1 M
SHH	SR, HiDMG, HiMSM	0,1 M, 0,01 M	1 M	1 M

Cada formulación se preparó para evaluar la actividad de unión residual a los 6 meses a +40 °C, por duplicado.

- 5 Una vez liofilizados, los viales se fotografiaron para documentar la calidad de las tortas producidas y después se colocaron en una incubadora a +40 °C para comenzar la exposición térmica. La temperatura se supervisó constantemente usando el sistema Kelsius.

Ensayo de actividad de $F(ab')_2$ bivalente

- 10 La actividad del $F(ab')_2$ bivalente se ensayó por ELISA. El antígeno (IgG2b kappa de rata) se diluyó a 0,5 µg/ml en PBS y se recubrieron pocillos de placas de ELISA con 100 µl. También se incluyeron dos pocillos de control de suero de ratón normal a una dilución de 1:400.000. Se ha descubierto que estos proporcionan resultados uniformes y se usaron para normalizar los datos. Las placas se incubaron durante 18 horas a +4 °C y después se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween 20 0,05 % (tampón de lavado). Las placas se secaron por absorción con una toalla de papel. Este método de absorción se usó en cada etapa de lavado. Las placas se bloquearon durante 1,5 horas con PBS que contenía leche desnatada en polvo 5 % y Tween 20 0,05 % (tampón de bloqueo). Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado antes de añadir las muestras.
- 15
- 20 Después de la incubación en exposición térmica, las formulaciones de $F(ab')_2$ se retiraron del incubador y se reconstituyeron en 1 ml de tampón de lavado. Esto dio como resultado la concentración de anticuerpo requerida para el ELISA (2 µg/ml). Cada muestra diluida se añadió a la placa por duplicado y se diluyó 2 veces por la placa (las concentraciones finales variaron de 2 µg/ml a 0,0625 µg/ml). El volumen final en cada pocillo fue de 100 µl. También se incluyó una condición sin mAb (solamente con tampón de lavado) para medir la señal de fondo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1,5 horas después de lo cual las placas se lavaron cinco veces con tampón de lavado.

- 30 Se diluyó un anticuerpo de cabra conjugado con HRP antihumano 1:5.000 en tampón de lavado y se añadieron 100 µl a todos los pocillos (se diluyó un conjugado con HRP de conejo anti ratón hasta 1:1.000 y se añadieron 100 µl a los pocillos de control de suero de ratón). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1,5 horas y después se lavaron cinco veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 µl de cromógeno estabilizado por TMB a cada pocillo y se permitió que reaccionaran durante 20 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual se añadieron 100 µl de ácido sulfúrico 200 mM para detener la reacción. Las placas se leyeron a 450 nm usando lector de microplacas Synergy HT.

35 *Análisis estadístico*

- 40 Se tomó el promedio y el error típico para cada duplicado y los puntos de datos se representaron como una gráfica de barras a una concentración de $F(ab')_2$ designada. Los resultados se normalizaron con respecto a los controles de suero de ratón normales. Cada resultado se dividió por el promedio de los dos pocillos de control positivos para la placa (cada placa tuvo un control positivo separado).

Resultados

- 45 *Actividad de fragmentos $F(ab')_2$ bivalentes después de tratamiento térmico a +56 °C durante 24 horas en un entorno líquido.*

- 50 Como se ha explicado en el Ejemplo 1 y se representa en la Figura 1, los fragmentos $F(ab')_2$ bivalentes fueron extremadamente termolábiles con poca actividad restante después de 24 horas a 56 °C, lo que proporciona un punto de partida excelente para ensayar la capacidad de los excipientes para estabilizar este anticuerpo.

Actividad de fragmentos $F(ab')_2$ bivalentes después de tratamiento térmico a +40 °C con y sin excipientes en un entorno sólido.

5 El $F(ab')_2$ se sometió a exposición térmica a +40 °C en presencia de diversas combinaciones y concentraciones de excipientes y se ensayó a los 6 meses. La Figura 5 muestra datos después de 6 meses a +40 °C; --- indica solamente PBS y S-- indica solamente azúcar.

Conclusión

10 Puede verse en la Figura 1 que los fragmentos $F(ab')_2$ bivalentes son extremadamente termolábiles. La liofilización ayuda a conservar la actividad de unión del anticuerpo durante hasta 6 meses a +40 °C incluso en una formulación básica. La adición de concentraciones de azúcar bajas potencia esta protección, que se potencia después adicionalmente con la adición de MSM o DMG. La adición de DMG y MSM juntos proporciona un efecto protector mayor que el de DMG o MSM solos con azúcar bajo. Esto indica sinergia.

Ejemplo 4

Métodos

20 Se prepararon y ensayaron soluciones que contenían el anticuerpo monoclonal (mAb) IgG de ratón anti *Neisseria gonorrhoeae* conjugado con HRP con y sin diversas mezclas de los excipientes ("preLio"). Estas soluciones se liofilizaron después y algunas de las tortas sólidas resultantes se resuspendieron inmediatamente en el volumen original y se ensayaron ("postLio"). Estas muestras se usaron para dilucidar la capacidad lioprotectora de las nuevas mezclas de excipientes.

25 Las tortas sólidas restantes se sometieron a exposición térmica a 40 °C durante dos meses antes de ensayarse. Estas muestras se usaron para dilucidar la capacidad termoprotectora de las nuevas mezclas de excipientes.

30 Se usó HPLC-SEC para ensayar la cantidad y la distribución de tamaño hidrodinámico de proteína a granel en muestras liofilizadas ± sometidas a exposición térmica en comparación con los controles líquidos formulados y no tratados (preLio). De esta manera, se usó HPLC-SEC para seguir los cambios del contenido de proteínas a granel del mAb en respuesta a la liofilización en sí misma y a la exposición térmica.

35 *Preparación y exposición térmica de anticuerpo monoclonal IgG de ratón anti Neisseria gonorrhoeae conjugado con HRP en un entorno sólido con excipientes*

40 Todas las condiciones se liofilizaron como alícuotas de 300 µl que contenían una concentración de anticuerpo de 167 µg/ml. La composición de las cuatro condiciones de mezcla de excipientes y el control sin excipientes se documentan en la Tabla 7. Se prepararon mezclas maestras correspondientes a estas cinco condiciones de modo que cada una contenía suficiente para proporcionar viales liofilizados por duplicado en cada punto de tiempo-temperatura más suficiente exceso para permitir que se ensayen los controles líquidos preLio.

Tabla 7: detalles de formulaciones de excipientes

Abreviatura	Descripción	DMG	manitol
hiDMG/manitol	[DMG] Alto, [manitol] fijo en PBS	1 M	0,55M
mdDMG/manitol	[DMG] Medio, [manitol] fijo en PBS	0,7M	0,55M
loDMG/manitol	[DMG] Bajo, [manitol] fijo en PBS	0,3M	0,55M
Man solamente	[manitol] Fijo solamente en PBS	-	0,55M
PBS solamente	PBS solamente	-	-

45 Los viales se liofilizaron usando un liofilizador VirTis Advantage en la receta 6, como se describe en el Ejemplo 1. Después de la liofilización, con la excepción de las muestras destinadas a ensayo post liofilización inmediato, las muestras se almacenaron después en una cámara de incubación a +40 °C.

50 *Ensayo de HPLC-SEC de la actividad de la actividad de IgG de ratón anti Neisseria gonorrhoeae conjugado con HRP*

55 La distribución de tamaños e intensidad hidrodinámicos se siguieron a 214 nm usando HPLC-SEC. El tampón usado fue sulfato sódico 0,1 M y fosfato sódico 0,1 M ajustados a un pH final a temperatura ambiente de 6,8 usando ácido sulfúrico concentrado. El tampón se pasó a través de un filtro de 0,45 antes de su uso. La HPLC realizó de forma automática la desgasificación. El caudal fue de 0,75 ml. El volumen de inyección de muestra fue de 25 µl. La HPLC se equipó con un autocargador de muestras y la cámara de muestras se mantuvo a 4 °C. La camisa de columna que rodeaba la columna se mantuvo a 25 °C. El perfil de absorción de cada muestra se siguió durante 24 minutos

después de la inyección. Las muestras se inyectaron en bloques puntuados tanto por etapas de lavado, en las que se procesó tampón, pero no muestra, por el sistema, como por patrones, que sirvieron para asegurar el funcionamiento uniforme del sistema.

- 5 Las muestras se inyectaron por duplicado como repeticiones (preLio) o replicados de viales separados (postLio y después de exposición térmica).

Procesamiento de perfiles

- 10 No se intentó la cuantificación de picos mediante integración debido a la complejidad y confusión de las muchas especies solapantes presentes en el perfil. En su lugar, se realizó una evaluación cualitativa en la que el perfil se trató como una "identificación". Se observaron cambios del perfil de control (líquido, preliofilizado) que se produjeron en los perfiles de muestras no de control. Para mayor claridad, se eligió una única traza representativa de cada condición para su presentación.

15

Resultados

Construcción y procesamiento de curvas patrón

- 20 Se usó un procesamiento de patrones representativos como una medida de seguridad de la calidad en este estudio. Se incluyeron cinco especies en la mezcla de patrones y se enumeran en la Tabla 8.

Tabla 8: Tamaños y volúmenes de conservación de los patrones de HPLC-SEC

tamaño/kD	log[tamaño]	RT/min
670	2,826075	8,44
158	2,198657	11,56
44	1,643453	13,46
17	1,230449	14,91
1,35	0,130334	18,04

- 25 Los dos últimos se usaron para construir una curva patrón mostrada, que se usó posteriormente para estimar los tamaños de picos de interés.

Lioprotección: condiciones pre y post Lio

- 30 Durante la siguiente descripción de la conservación de área pico, se pondrá énfasis en el mayor punto del complejo pico. Este punto comienza a los 8 minutos y se asocia con un tamaño estimado de 1,07 MDa (usando la curva patrón analizada anteriormente). Se conjugó HRP de forma postraduccional mediante un proceso químico que unió covalentemente el resto con ciertos restos expuestos en superficie en el mAb; el gran tamaño de pico inicial sugiere que se utilizaron múltiples sitios de adhesión.

35

La Figura 6 indica que todas las áreas picos fueron mayores antes de la liofilización que después de ella para todas las muestras. Después de la liofilización, el mayor descenso de la conservación de área pico se produjo solamente en la condición de PBS; todas las otras condiciones mostraron esencialmente una conservación de área pico equivalente quedando la de solamente manitol un poco por detrás de las tres condiciones que contienen DMG.

40

Un nuevo pico es observable después de la liofilización en las muestras de solamente manitol y [DMG 0,3 M y manitol]. Este pico tuvo un tiempo de conservación de 12,4 minutos y se asocia con un tamaño estimado de 77 kDa (usando la curva patrón analizada anteriormente).

- 45 Tomados juntos estos resultados indican que los óptimos tanto para la conservación de área pico como para la fidelidad de perfil se produjeron con muestras que contenían [DMG 0,7 M y manitol] o [DMG 1,0 M y manitol].

Termoprotección: condiciones de exposición térmica de 2 meses

- 50 La Figura 7 muestra que después de dos meses a 40 °C se observó el mayor descenso de área pico en condiciones de PBS y solamente manitol, presentando ambas áreas pico cercanas a los niveles de línea basal. Las tres muestras restantes, todas las cuales contienen DMG además de manitol, conservan el perfil general de la condición de control positivo preLio (líquida) mostrada en la Figura 6. De estas tres muestras que contienen DMG, la mayor conservación de área pico se produjo en la condición que contenía [DMG 0,7 M y manitol]. Las otras dos

55

condiciones presentaron conservaciones de área pico esencialmente equivalentes.

Estos resultados indican que, después de la exposición térmica, el manitol solo fue insuficiente para conservar el perfil del mAb (como lo fue PBS) y que la adición de DMG fue capaz de conservar el perfil del mAb. Además, la ausencia de DMG se asoció esencialmente con una ausencia de la masa a granel pico principal (la masa que comienza con el pico a 7,85 minutos que se correlaciona con un peso estimado de aproximadamente 1,07 MDa) mientras que su adición se asoció con la mayor conservación de área pico.

La cantidad óptima de DMG ensayada (en coincidencia con manitol 0,55 M) fue de 0,7 M pero tanto 0,3 M como 1,0 M también fueron capaces de conservar el perfil.

10 Conclusión

Los datos presentados y analizados en el presente documento indican que el manitol y DMG más manitol podrían conservar las características generales del perfil cromatográfico del mAb mediante el proceso de liofilización mientras que PBS solo no podría. Después de exposición térmica adicional, se observó mejor conservación de área pico en muestras que contenían DMG. Se conservó la integridad del perfil en condiciones que contenían las dos concentraciones mayores de DMG pero no en la condición de solamente manitol o en la menor condición de DMG.

La presencia de DMG tuvo un impacto positivo significativo en la conservación de área pico y fue necesaria para conservar la fidelidad del perfil después de tratamiento de la tensión durante 2 meses a 40 °C. Las condiciones tanto de solamente manitol como de PBS fueron de conservación de área pico diezmada y no conservaron la fidelidad del perfil.

La conclusión general fue que la condición óptima tanto para lioprotección como para termoprotección fue DMG medio (0,7 M) y manitol 0,55 M.

25 Ejemplo 5

Métodos

30 El fragmento monovalente de unión a antígeno (Fab) se sometió a exposición térmica en presencia de diversas concentraciones de excipientes y se ensayó en diferentes puntos. Se usó un ensayo de ELISA para evaluar la actividad de Fab residual. Esta se usó como una medida del alcance del daño recibido.

Preparación y exposición térmica de fragmento monovalente Fab en un entorno sólido con excipientes

35 Para determinar las propiedades protectoras de los excipientes descritos en la sección 4.1 en un entorno sólido, se distribuyeron en alícuotas 300 µl de cada formulación con una concentración de anticuerpo de 6,7 µg/ml en viales de liofilización de vidrio y se liofilizaron usando el programa 1 en un liofilizador Virtis como se ha descrito en el Ejemplo 2. Los detalles de cada formulación se exponen en la Tabla 9.

Tabla 9: detalles de formulaciones de excipientes

Abreviatura	Descripción	Sac/Raf (SR)	DMG (D)	MSM (M)
S--	SR, sin DMG, sin MSM	0,1 M, 0,01 M	-	-
S-L	SR, sin DMG, LoMSM	0,1 M, 0,01 M	-	0,1 M
S-H	SR sin DMG, HiMSM	0,1 M, 0,01 M	-	1 M
SL-	SR LoDMG, sin MSM	0,1 M, 0,01 M	0,1 M	-
SLL	SR, LoDMG, LoMSM	0,1 M, 0,01 M	0,1 M	0,1 M
SLH	SR, LoDMG, HiMSM	0,1 M, 0,01 M	0,1 M	1 M
SH-	SR, HiDMG, sin MSM	0,1 M, 0,01 M	1 M	-
SHL	SR, HiDMG, LoMSM	0,1 M, 0,01 M	1 M	0,1 M
SHH	SR, HiDMG, HiMSM	0,1 M, 0,01 M	1 M	1 M

Cada formulación se preparó para evaluar la actividad de unión residual a los 6 meses a +4 °C, por duplicado.

45 Una vez liofilizados, los viales se colocaron en una nevera a +4 °C para comenzar la exposición térmica, cuya temperatura se supervisó y se registró constantemente con respecto a cualquier fluctuación de temperatura usando el sistema de supervisión de temperatura Kelsius.

Ensayo de actividad de Fab Monovalente

50 La actividad del Fab monovalente se ensayó mediante ELISA. Se diluyó antígeno (IgG2b kappa de rata) a 2,5 µg/ml en PBS y se recubrieron pocillos de placas de ELISA con 100 µl. También se incluyeron dos pocillos de suero de

ratón normal a una dilución 1:400.000. Se ha descubierto que esto proporciona resultados uniformes y se usó para normalizar los datos. Las placas se incubaron durante 18 horas a +4 °C y después se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween 20 0,05 % (tampón de lavado). Las placas se secaron por absorción con una toalla de papel. Este método de absorción se usó en cada etapa de lavado. Las placas se bloquearon durante 1,5 horas con PBS que contenía leche desnatada en polvo a 5 % y Tween 20 a 0,05 % (tampón de bloqueo).

Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado antes de añadir las muestras. Después de incubación en exposición térmica, las formulaciones de Fab se retiraron de la nevera y se reconstituyeron en 1 ml de tampón de lavado. Esto dio como resultado la concentración de anticuerpo requerida para el ELISA (2 µg/ml). Cada muestra diluida se añadió a la placa por duplicado y se diluyó 2 veces por la placa (las concentraciones finales variaron de 2 µg/ml a 0,0625 µg/ml). El volumen final en cada pocillo fue de 100 µl. También se incluyó una condición sin mAb (solamente tampón de lavado) para medir la señal de fondo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1,5 horas, después de lo cual las placas se lavaron cinco veces con tampón de lavado.

Se diluyó un anticuerpo de cabra anti-humano conjugado con HRP 1:5.000 en tampón de lavado y se añadieron 100 µl a todos los pocillos (se diluyó un conjugado con HRP de conejo anti-ratón a 1:1.000 y se añadieron 100 µl a los pocillos de control de suero de ratón). Las placas se incubaron a TA 1,5 horas y después se lavaron cinco veces con tampón de lavado.

Se añadieron 100 µl de cromógeno estabilizado con TMB a cada pocillo y se permitió que reaccionara durante 20 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual se añadieron 100 µl de ácido sulfúrico 200 mM para detener la reacción. Las placas se leyeron a 450 nm usando el lector de microplacas Synergy HT.

Análisis estadístico

Se tomó el promedio y el error típico para cada duplicado y los puntos de datos se representaron como una gráfica lineal o como una gráfica de barras a una concentración de Fab designada. Los resultados se normalizaron a un control de anticuerpo de reserva de 4 °C. Cada resultado se dividió por el promedio de los dos pocillos de control positivo para la placa (cada placa tuvo un control positivo separado).

Resultados

Actividad de fragmentos Fab monovalentes después de tratamiento térmico a +56 °C durante 24 horas en un entorno líquido.

En un estudio preliminar, se almacenó Fab de reserva (como se proporcionó por AbD Serotec - concentración 1 mg/ml) a +56 °C para evaluar la estabilidad inicial a temperaturas elevadas. Los resultados se muestran en la Figura 8, en la que los datos no normalizados y las barras de error son desviación típica, n=2. Se descubrió que el anticuerpo era extremadamente termolábil con poca actividad restante después de 24 horas a 56 °C, lo que proporciona un excelente punto de partida para ensayar la capacidad de los excipientes de los inventores para estabilizar este anticuerpo.

Actividad de fragmentos Fab monovalentes después de tratamiento térmico a +4 °C con y sin excipientes en un entorno sólido.

El Fab se sometió a exposición térmica en presencia de diversas combinaciones y concentraciones de excipientes y se ensayó después de 6 meses a +4 °C. La Figura 9 muestra datos a los 6 meses a +4 °C; S-- indica solamente azúcar. (Las barras de error son desviación típica, n=2)

Después de almacenamiento a +4 °C, la adición de azúcar solamente no fue suficiente para proteger a los 6 meses. Cuando se combinó MSM con alto DMG y azúcar (SHL y SHH), el nivel de protección es mucho mayor, lo que indica sinergia. Esto se potencia adicionalmente con la adición de más MSM.

Conclusión

Puede verse en la Figura 8 que los fragmentos Fab monovalentes son extremadamente termolábiles. La liofilización ayuda a conservar la actividad de unión a anticuerpo durante hasta 6 meses a +4 °C incluso en una formación de solamente azúcar básica. El uso de azúcar, MSM y DMG en combinación puede dar como resultado sinergia.

Ejemplo 6

Métodos

Diseño del experimento

Se usó MODDE 9.0 para generar un diseño de Doehlert (véase Tabla 10 posterior). Los diseños de Doehlert son

una forma de diseño de modelización de superficie de respuesta (MSR) a partir de modelos sencillos regulares y cuadráticos de soporte. Los diseños de Doehlert son extensibles en diferentes direcciones y pueden añadirse nuevos factores a un diseño existente. A diferencia de los diseños de formulaciones regulares, los factores no significativos pueden eliminarse del análisis y de este modo no se convierten en un factor de confusión.

5
Citocinas usadas en este estudio

10 Durante el cultivo celular rutinario de M-NFS-60s, las células se estimularon usando factor estimulante de colonias de macrófagos de ratón recombinante purificado (M-CSF de ratón) de acuerdo con las recomendaciones de la ATCC. Se obtuvo M-CSF de ratón a partir de Milteny Biotec (número de producto 130-094-129) y se proporcionó sin formular.

15 Se realizaron estudios de estabilidad usando factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) no formulado obtenido de Peprotech (300-23). Este G-CSF se expresó en *E. coli* y se proporcionó sin formular. La actividad de este G-CSF se determinó por el fabricante como $\geq 1 \times 10^7$ unidades/mg.

Células M-NFS-60

20 Se recuperaron células M-NFS-60 de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se usó un único pase de estas células para producir un banco de almacenamiento de células. Se produjeron alícuotas de 1 ml de células de pase 1 con células a $6,43 \times 10^5$ células/ml en medio de cultivo RPMI, y DMSO 5 %, y suero bovino fetal al 10 % (FBS). Las alícuotas se congelaron a -80 °C antes de la transferencia posterior a almacenamiento en nitrógeno líquido. Este banco de células se usó para establecer cultivos adicionales para esta investigación.

25 *Mantenimiento rutinario de células M-NFS-60*

30 Las células se mantuvieron de acuerdo con las directrices de la ATCC. Brevemente, las células se propagaron en medio RPMI-1.640 más β -mercaptoetanol 0,05 mM, FBS 10 %, penicilina estreptomicina 1 % y M-CSF 62 ng/ml. Las células se cultivaron a +37 °C, CO₂ +5 %. Las células se sembraron a $2,5 \times 10^4$ células viables/ml.

Preparación, liofilización y exposición térmica de G-CSF

35 Se prepararon excipientes en tampón de acetato como se describe en la Tabla 10.

Tabla 10

Número de Muestra	Reserva de sólidos inicial		Reserva de DoE		Proteína		Reserva de DoE		Reserva de sólidos inicial		Peso en 5 ml (g)		Reserva de proteínas (µg/ml)
	Rafinosa (mM)	DMG (M)	DMG (M)	Sacarosa (M)	(µg/ml)	Sacarosa (M)	Rafinosa (mM)	DMG (M)	Sacarosa (M)	Rafinosa	DMG	Sacarosa	
1	333,3	1,1	1,1	0,8	250,0	444,4	1,5	1,1	1,12	1,11	0,83	1.000,0	
2	250,0	2,1	0,8	0,8	250,0	333,3	2,8	1,1	0,84	2,07	0,83	1.000,0	
3	250,0	1,4	1,5	1,5	250,0	333,3	1,9	2,0	0,84	1,43	1,51	1.000,0	
4	250,0	1,4	1,0	1,0	368,6	333,3	1,9	1,3	0,84	1,43	1,00	1474,3	
5	0,0	1,1	0,8	0,8	250,0	0,0	1,5	1,1	0,00	1,11	0,83	1.000,0	
6	83,3	0,1	0,8	0,8	250,0	111,1	0,2	1,1	0,28	0,15	0,83	1.000,0	
7	83,3	0,8	0,2	0,2	250,0	111,1	1,1	0,2	0,28	0,79	0,15	1.000,0	
8	83,3	0,8	0,7	0,7	131,4	111,1	1,1	0,9	0,28	0,79	0,66	525,7	
9	250,0	0,1	0,8	0,8	250,0	333,3	0,2	1,1	0,84	0,15	0,83	1.000,0	
10	250,0	0,8	0,2	0,2	250,0	333,3	1,1	0,2	0,84	0,79	0,15	1.000,0	
11	250,0	0,8	0,7	0,7	131,4	333,3	1,1	0,9	0,84	0,79	0,66	525,7	
12	166,7	1,8	0,2	0,2	250,0	222,2	2,3	0,2	0,56	1,75	0,15	1.000,0	
13	166,7	1,8	0,7	0,7	131,4	222,2	2,3	0,9	0,56	1,75	0,66	525,7	
14	166,7	1,1	1,3	1,3	131,4	222,2	1,5	1,8	0,56	1,11	1,34	525,7	
15	83,3	2,1	0,8	0,8	250,0	111,1	2,8	1,1	0,28	2,07	0,83	1.000,0	
16	83,3	1,4	1,5	1,5	250,0	111,1	1,9	2,0	0,28	1,43	1,51	1.000,0	
17	83,3	1,4	1,0	1,0	368,6	111,1	1,9	1,3	0,28	1,43	1,00	1474,3	
18	166,7	0,5	1,5	1,5	250,0	222,2	0,6	2,0	0,56	0,47	1,51	1.000,0	
19	166,7	0,5	1,0	1,0	368,6	222,2	0,6	1,3	0,56	0,47	1,00	1474,3	
20	166,7	1,1	0,3	0,3	368,6	222,2	1,5	0,4	0,56	1,11	0,32	1474,3	
21	166,7	1,1	0,8	0,8	250,0	222,2	1,5	1,1	0,56	1,11	0,83	1.000,0	
22	166,7	1,1	0,8	0,8	250,0	222,2	1,5	1,1	0,56	1,11	0,83	1.000,0	
23	166,7	1,1	0,8	0,8	250,0	222,2	1,5	1,1	0,56	1,11	0,83	1.000,0	

Las masas de cada excipiente se pesaron y disolvieron en 3 ml de tampón de acetato precalentado. Se aplicó un breve periodo de calentamiento en un microondas y agitación vorticial. Una vez completamente disuelto, el volumen total se compuso hasta 5 ml con tampón de acetato adicional. Las soluciones se compusieron deliberadamente a 1,3x la concentración deseada final (de acuerdo con el diseño mostrado en la Tabla 10).

5 Se prepararon viales de vidrio de 2 ml que contenían 75 µl de mezcla de excipientes y 25 µl de G-CSF (a concentraciones indicadas en la Tabla 10). Se preparó un vial para cada formulación descrita en la Tabla 10.

Los viales se cargaron en una placa de aluminio y se liofilizaron como se ha descrito en el Ejemplo 2.

10 Tras completar el ciclo de liofilización la máquina mantuvo las muestras a +4 °C hasta que se pudieron recuperar. Los viales se sellaron en vacío, y sus tortas se fotografiaron y se puntuaron de 1 a 5 antes de transferirse a +56 °C durante una exposición térmica de 4 días. Después de la exposición térmica las muestras se transfirieron a +4 °C hasta que fue práctico ensayarlas.

15 *Ensayo de G-CSF en células M-NFS-60 usando XTT (sal interna de 2,3-bis [2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolio-5-carboxianilida)*

20 Las células se suspendieron en RPMI-1.640 que contenía FBS a 10 %, penicilina estreptomycin a 1 % y β-mercaptoetanol 0,05 mM, pero sin citocinas. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a 20.000 células por pocillo, 190 µl/pocillo.

25 Las muestras de G-CSF liofilizadas se recuperaron de refrigeración y se reconstituyeron en 100 µl de agua estéril. Se retiraron 20/µl de cada muestra y se diluyeron 1 en 3 en RPMI-1640. Se produjeron siete diluciones más a partir de la dilución 1 en 3 por dilución en serie décupla, produciendo de este modo una serie de diluciones décuplas de 1 en 3 a 1 en 3x10⁷. Cada dilución se añadió a un pocillo en 3 placas separadas, a 10 µl por pocillo.

30 Adicionalmente, se recuperó G-CSF no formulado de almacenamiento a +4 °C y se reconstituyó hasta una concentración de 15 µg/ml en agua estéril. Esta muestra se diluyó 1 en 100 para producir un patrón inicial de 150 ng/ml. Se produjo una serie de diluciones semi Log₁₀ para generar una curva patrón entre 150 ng/ml y 0,05 ng/ml. Cada patrón se añadió a 3 pocillos por placa a 10/µl por pocillo.

35 Las placas se colocaron después a +37 °C, CO₂ +5 % (EQP#014) durante 72 horas. Después de 72 horas se reconstituyeron viales de XTT con PMS 1 % en PBS (5 ml por vial). Se reconstituyeron múltiples viales y estos viales se agruparon antes del uso. Se añadieron 40 µl de la solución de XTT por pocillo y las placas se devolvieron a +37 °C, CO₂ +5 % durante 8 horas adicionales. En este momento se proporcionó a las placas una mezcla suave para dispersar formazán de XTT y después se midió la absorbancia a 450 nm y 690 nm en un lector de placas.

Estimación de G-CSF recuperado

40 Se restó la absorbancia a 690 nm de la absorbancia a 450 nm para cada muestra. La concentración conocida de patrones se representó frente a la absorbancia normalizada y se identificó la parte de la curva que mostraba aumento exponencial. Los puntos de datos en este intervalo de concentraciones se representaron como el log natural de la concentración frente a la absorbancia normalizada.

45 Se produjo una línea de regresión de mínimos cuadráticos para los patrones en cada placa por separado. La fórmula para esta curva o patrón se usó después para estimar la concentración de G-CSF en cada tratamiento formulado en esa placa particular. La dilución de G-CSF que estaba más diluida y aun así estaba dentro del intervalo de absorbancia dinámico del ensayo se usó para estimar la concentración que se ajustó en relación con el factor de dilución conocido.

50 Ya que diferentes formulaciones comprendían concentraciones de G-CSF de partida diferentes, se convirtió la concentración estimada después de la exposición térmica a un porcentaje del valor de partida para permitir una comparación justa. Se usó un promedio de las tres mediciones tomadas en análisis posteriores.

Resultados

60 Se evaluó la calidad de la torta producida en este estudio por fotografía de las tortas inmediatamente después de liofilización y puntuación posterior de 0 (muy mala) a 5 (muy buena). Esta evaluación es bastante subjetiva y la escala no es necesariamente estrictamente lineal, además esta evaluación intenta capturar múltiples efectos, por ejemplo colapso de la torta, fusión, contracción, etc. Sin embargo, las puntuaciones siguen siendo útiles y se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11

	Diseño de DoE				% de Actividad Recuperada	Calidad de la Torta
	Rafinosa (mM)	DMG (M)	Sacarosa (M)	Proteína (µg/ml)		
1	333,3	1,1	0,8	250,0	8,5	1,5
2	250,0	2,1	0,8	250,0	29,4	0,5
3	250,0	1,4	1,5	250,0	14,3	4,0
4	250,0	1,4	1,0	368,6	153,7	1,5
5	0,0	1,1	0,8	250,0	6,7	1,0
6	83,3	0,1	0,8	250,0	5,6	4,0
7	83,3	0,8	0,2	250,0	24,9	2,0
8	83,3	0,8	0,7	131,4	16,0	2,5
9	250,0	0,1	0,8	250,0	34,2	4,5
10	250,0	0,8	0,2	250,0	56,0	3,0
11	250,0	0,8	0,7	131,4	39,2	2,8
12	166,7	1,8	0,2	250,0	68,0	0,5
13	166,7	1,8	0,7	131,4	53,0	1,0
14	166,7	1,1	1,3	131,4	134,1	1,5
15	83,3	2,1	0,8	250,0	17,1	0,5
16	83,3	1,4	1,5	250,0	70,2	1,0
17	83,3	1,4	1,0	368,6	92,3	1,0
18	166,7	0,5	1,5	250,0	142,1	1,5
19	166,7	0,5	1,0	368,6	115,4	3,5
20	166,7	1,1	0,3	368,6	72,5	2,0
21	166,7	1,1	0,8	250,0	110,2	1,0
22	166,7	1,1	0,8	250,0	76,3	1,0
23	166,7	1,1	0,8	250,0	72,1	0,5

Aunque puede ser importante tener una torta elegante, una prioridad de este estudio fue maximizar la actividad de G-CSF recuperada y la calidad de la torta fue un factor secundario.

- 5 La actividad recuperada se expresó como un porcentaje de actividad de partida debido a que cada formulación tuvo diferente actividad de partida y esto permitió una mejor comparación de las formulaciones. La actividad recuperada también presentó un intervalo en las respuestas aunque la mayoría estaban dentro de una pérdida de LOG y todas estuvieron dentro de una pérdida de 1,5 LOG. La respuesta varió de 5,6 a 153 % (véase Tabla 11). El hecho de que varias formulaciones produjeran actividad recuperada de más del 100 % es supuestamente un producto de la variabilidad inherente dentro de este ensayo. Los puntos centrales mostraron una dispersión relativamente amplia en esta respuesta (72,1-110,2 %), pero ya que podrían ajustarse modelos significativos, se cree que esta propagación es suficientemente pequeña en relación con la variación entre formulaciones en respuesta.
- 10 Podrían ajustarse modelos significativos para ambas de estas respuestas (véase Figura 10). Para actividad recuperada los parámetros de evaluación de modelo son $R^2=0,79$, $Q^2=0,41$, Validez del Modelo=0,51, Reproducibilidad=0,95. Por otro lado para calidad de torta son $R^2=0,84$, $Q^2=0,53$, Validez de Modelo = 0,91, Reproducibilidad = 0,68.
- 20 Para actividad recuperada, la concentración de proteína tuvo un efecto lineal positivo. Cuanto mayor fue la concentración de proteína mayor fue la estabilidad. Se observaron efectos cuadráticos (no lineales) tanto de DMG como de rafinosa, lo que permitió la identificación de un verdadero óptimo en su concentración. Se descubrió que la sacarosa no tiene ningún efecto en la actividad recuperada por sí sola, pero tiene una interacción con rafinosa. Se

muestran coeficientes conservados en el modelo junto con una indicación del tamaño del efecto en la Figura 11.

5 Se usaron simulaciones de Monte-Carlo para predecir formulaciones que maximizaron la actividad recuperada. Ya que la calidad de la torta se vio como un factor secundario, este se ignoró en este análisis inicial. Se identificó un óptimo de Rafinosa 203,9 mM, DMG 1,3 M, Sacarosa 0,45 M y 300 µg/ml. Se predijo que este óptimo no produciría pérdida de actividad.

10 Las representaciones de contorno 4D de la región óptima (Figura 12) demuestran claramente una concentración de DMG óptima de aproximadamente 1,2 M. El aumento de la concentración de proteínas aumenta la región alrededor de este óptimo de DMG teórico donde se predice 100 % de recuperación. La Figura también demostró el efecto cuadrático de rafinosa y un óptimo evidente de 203,9 mM.

15 La Figura 13 muestra la misma región de espacio de formulación y está marcado el óptimo. Sin embargo, la respuesta representada aquí es la calidad de torta. Este modelo muestra que el aumento de sacarosa potencia la calidad de la torta. Se muestra que el aumento de la concentración de la proteína en sí misma mejora la calidad de la torta como lo hace el aumento de la concentración de rafinosa.

20 Un análisis posterior usó simulaciones de Monte-Carlo para maximizar la actividad recuperada mientras que también se maximizaba la calidad de la torta. Se dio a las dos respuestas igual peso. Esto identificó una formulación óptima de rafinosa 250 mM, DMG 0,6 M, sacarosa 0,15 M, proteína 300 µg/ml. Las estimaciones de respuestas fueron una calidad de torta de 4,7 y una actividad recuperada de 76,5 %.

25 Las Figuras 14 y 15 muestran representaciones de contorno 4D de las dos respuestas (como en las Figuras 12 y 13) pero alrededor del nuevo óptimo identificado en el segundo análisis.

Ejemplo 7

Métodos

30 *Diseño de experimento*

Se usó MODDE 9.0 para generar un diseño de Doehlert (véase Tabla 12 posterior). Se describen diseños de Doehlert en el Ejemplo 6.

35 *Citocinas utilizadas en este estudio*

Las células M-NFS-60s se obtuvieron, se prepararon y se mantuvieron como se ha descrito en el Ejemplo 6. El G-CSF también fue como se ha descrito en el Ejemplo 6.

40 *Preparación, liofilización y exposición térmica de G-CSF*

Los excipientes se prepararon en tampón de acetato como se describe en la Tabla 12.

Tabla 12

Número de Muestra	Diseño de DoE		Reserva de sólidos inicial				Peso en 5 ml (g)			
	Rafinosa (mM)	TMG (M)	Sacarosa (M)	Rafinosa (mM)	TMG (M)	Sacarosa (M)	Rafinosa	TMG	Sacarosa	
1	150,50	1,00	0,80	0,1	0,1	0,3	0,10	0,08	0,44	
2	150,50	0,78	1,41	0,1	0,2	0,3	0,10	0,25	0,44	
3	272,57	0,78	1,00	0,1	0,2	0,7	0,10	0,25	0,90	
4	150,50	0,10	0,80	0,4	0,2	1,0	0,51	0,25	1,36	
5	150,50	0,33	0,19	0,4	0,2	1,0	0,51	0,25	1,36	
6	28,43	0,33	0,60	0,4	0,3	1,4	0,51	0,43	1,83	
7	150,50	0,78	0,19	0,4	0,3	1,4	0,51	0,43	1,83	
8	28,43	0,78	0,60	0,4	0,3	1,4	0,51	0,43	1,83	
9	28,43	0,55	1,20	0,4	0,3	1,4	0,51	0,43	1,83	
10	150,50	0,33	1,41	0,4	0,3	1,4	0,51	0,43	1,83	
11	272,57	0,33	1,00	0,4	0,5	1,7	0,51	0,61	2,29	
12	272,57	0,55	0,40	0,4	0,5	1,7	0,51	0,61	2,29	
13	150,50	0,55	0,80	0,7	0,5	2,1	0,92	0,61	2,75	
14	150,50	0,55	0,80	0,7	0,5	2,4	0,92	0,61	3,21	
15	150,50	0,55	0,80	0,7	0,6	2,4	0,92	0,78	3,21	

Se pesan masas de cada excipiente y se disuelven en 3 ml de tampón de acetato precalentado. Se aplicó un breve periodo de calentamiento en un microondas y agitación vorticial para ayudar a la disolución. Una vez completamente disuelto se preparó el volumen total hasta 5 ml con tampón de acetato adicional. Las soluciones se compusieron deliberadamente a 1,3 veces la concentración final deseada (de acuerdo con el diseño mostrado en la Tabla 12).

5 Se prepararon viales de vidrio de 2 ml que contenían 75 µl de mezcla de excipientes y 25 µl de G-CSF (a una concentración de 1.200 µg/ml, por tanto la concentración final en el vial fue de 300 µg/ml). Se preparó un vial para cada formulación descrita en la Tabla 12.

10 Los viales se colocaron en una placa de aluminio y se cargaron y se liofilizaron como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Al completar el ciclo de liofilización la máquina mantuvo las muestras a +4 °C hasta que pudieran recuperarse. Los viales se sellaron en vacío, y sus tortas se fotografiaron, y se puntuaron de 0 a 5 para calidad de torta antes de transferirse a +56 °C durante 4 días de exposición térmica. Después de la exposición térmica las muestras se transfirieron a +4 °C hasta que fue práctico ensayarlas.

Ensayo de G-CSF y estimación de la actividad recuperada

Se ensayó G-CSF y se determinó la actividad recuperada como se ha descrito en el Ejemplo 6.

20 **Resultados**

Se observó un buen intervalo de respuestas de actividad recuperada de 12,3 a 81,1 % de actividad de partida, como se muestra en Tabla 13.

25

Tabla 13

	Diseño de DoE			% de Actividad Recuperada	Calidad de Torta
	Rafinosa (mM)	TMG (M)	Sacarosa (M)		
1	150,50	1,00	0,80	12,3	0,0
2	150,50	0,78	1,41	15,8	0,5
3	272,57	0,78	1,00	15,1	1,0
4	150,50	0,10	0,80	11,7	4,0
5	150,50	0,33	0,19	14,3	3,5
6	28,43	0,33	0,60	22,6	3,0
7	150,50	0,78	0,19	21,8	1,5
8	28,43	0,78	0,60	50,5	3,5
9	28,43	0,55	1,20	66,6	0,0
10	150,50	0,33	1,41	81,1	4,0
11	272,57	0,33	1,00	70,1	2,0
12	272,57	0,55	0,40	60,6	3,5
13	150,50	0,55	0,80	39,7	2,0
14	150,50	0,55	0,80	43,8	2,0
15	150,50	0,55	0,80	56,8	2,0

Esta buena propagación permitió ajustar un modelo relativamente fuerte. Ninguna de las formulaciones padeció una pérdida mayor que la logarítmica durante esta exposición térmica bastante significativa.

30 El intervalo de respuesta de la calidad de torta también fue bueno. Las respuestas variaron de 0 a 4,5, pero este sistema de puntuación muy subjetivo y artificial tiende a producir un intervalo de respuestas.

Potencia de los Modelos Ajustados

35 Se ajustó un modelo significativo a ambas respuestas. La actividad recuperada, que es la lectura primaria, proporcionó el modelo más fuerte como se valora por parámetros de evaluación de modelo ($R^2=0,87$, $Q^2=0,58$,

validez del modelo = 0,60, reproducibilidad = 0,93), como se muestra en Figura 16. El modelo ajustado para la calidad de torta fue menos fuerte como también se expone en la Figura 16, probablemente debido a la naturaleza subjetiva de la calidad de la torta.

5 Factores Críticos en los Modelos

Los factores críticos en el modelo se exponen en la Figura 17. Para actividad recuperada el único efecto lineal observado fue el de sacarosa que tuvo un efecto positivo, es decir el aumento de la sacarosa aumenta la actividad recuperada. Además de esto, se descubrió que TMG tenía un efecto no lineal, de segundo orden (es decir, se observó una concentración óptima) y también se descubrió que interaccionaba tanto con sacarosa como con rafinosa.

Identificación de Formulaciones Óptimas

15 Se usaron simulaciones de Monte-Carlo junto con el modelo ajustado para predecir formulaciones óptimas. El óptimo se generó con el objetivo específico de maximizar la actividad recuperada ignorando al mismo tiempo la respuesta menos crítica de la calidad de la torta. Se descubrió que el óptimo era Sacarosa 1,4 M, TMG 0,3 M y Rafinosa 150,5 mM y se predijo que produciría una actividad recuperada del 78,4 %.

20 Descripción de Modelo Ajustado

La Figura 18 muestra una representación de contorno del espacio de formulación que rodea la formulación óptima predicha. La respuesta representada en esta gráfica es actividad recuperada como porcentaje de la actividad de partida. Puede verse que puede conseguirse protección significativa por altos niveles de sacarosa. Tanto la rafinosa como TMG reducen la cantidad de sacarosa requerida. Puede ser necesario un compromiso entre la actividad recuperada y la calidad de la torta. Una formulación de rafinosa 150,5 mM, TMG 0,33 M, sacarosa 1,14 M proporcionó tanto buena actividad recuperada (81,1 %) como calidad de la torta (puntuación de calidad de la torta = 4).

30 Ejemplo 8

Métodos

Se examinaron muestras liofilizadas de formulación de manitol por calorimetría de exploración diferencial (DSC) para determinar si el manitol era amorfo o cristalino. Aunque el manitol se usa frecuentemente en formulaciones liofilizadas, está habitualmente cristalizado durante el ciclo debido a la inestabilidad a lo largo del tiempo de la forma amorfa.

Procedimiento de DSC

40 Se usó una DSC 4000 Perkin Elmer. Inicialmente, se procesó una muestra de iridio como se describe posteriormente para comprobar la calibración de la máquina. Esto implicó calentar la muestra de iridio de 20 °C a 200 °C a una velocidad de 20 °C por minuto. Se ve habitualmente una fusión endotérmica a 156,6 °C si se procesa la DSC de forma apropiada.

45 Después de la comprobación de calibración, las muestras se sellaron herméticamente en recipientes de muestra de aluminio y se equilibraron hasta 20 °C dentro de la DSC. Se usó un recipiente vacío como la referencia, y se colocó en la placa de calentamiento junto a la muestra. Después se procesó el programa, se calentó la muestra y la referencia a 20 °C por minuto, de 20 °C a 200 °C y después se enfrió de 200 °C a 20 °C a 20 °C por minuto.

Referencia de iridio

Se usó el iridio como material de referencia para asegurar que el equipamiento de DSC producía los resultados esperados. El iridio tiene una temperatura de fusión bien documentada de 156,6 °C. El valor obtenido en este estudio fue de 157,02 °C (véase Figura 20) que está dentro de los límites aceptables.

Manitol

60 Se procesó manitol de uso analítico convencional (Sigma) en la DSC como un control positivo para material cristalino. Los resultados se muestran en la Figura 21. El manitol en polvo mostró una clara fusión cristalina transparente a 166,9 °C, lo que está de acuerdo con los datos publicados. Durante la etapa de enfriado, hubo una clara exotérmica de cristalización transparente a 115 °C. Este experimento mostró tanto la fusión como la recristalización del manitol.

Manitol liofilizado a partir de una solución 274 mM

Se liofilizó manitol 274 mM a -40 °C durante 72 horas a aproximadamente 10 kPa (liofilizador Mechatec), en un intento de obtener manitol amorfo. Durante la etapa de calentamiento del análisis de DSC posterior, hubo una exotérmica de recristalización débil, antes de la fusión cristalina a 166,6 °C. Esto sugeriría que mucho del manitol se había recristalizado antes del análisis, debido a la Tg muy baja de manitol anhídrido de 10 °C. Los resultados de DSC se muestran en la Figura 22. Como se esperaba, se produjo una exotérmica de recristalización fuerte a aproximadamente 110 °C.

10 *Manitol liofilizado en solución salina tamponada con fosfato (PBS)*

Se liofilizó una muestra de manitol (530 mM) en PBS (3,9 mg). La muestra resultante se analizó por DSC y los resultados se muestran en la Figura 23. Hubo una fuerte endotérmica de fusión cristalina a aproximadamente 160 °C y una exotérmica de recristalización a aproximadamente 80 °C. A partir de esto puede concluirse que el manitol puede cristalizar y recristalizar en una formulación de solamente PBS.

Manitol liofilizado a partir de solución que contiene DMG

Se liofilizaron dos muestras que contenían manitol y DMG (manitol 550 mM, DMG 1M en PBS) usando el método descrito en la Tabla 14 usando un liofilizador VirTis Advantage. Las muestras se congelaron a -40 °C durante 120 minutos antes de aplicarse un vacío, inicialmente a 200 miliTorre. La temperatura de almacenamiento y el vacío se ajustaron a lo largo del proceso.

En la fase de secado primaria, la temperatura de almacenamiento también se redujo inicialmente a -45 °C. La fase de secado secundaria incluyó una serie de etapas de mantenimiento aumentando la temperatura hasta 30 °C hasta que se completó el secado. Las sondas registraron temperaturas de almacenamiento y temperaturas del condensador.

Tabla 14

Etapa	Temperatura de almacenamiento (°C)	Tiempo (minutos)	Variación/ Mantenimiento	Vacío (miliTorre)
1	-45	15	H	200
2	-34	30	R	200
3	-34	1200	H	200
4	-20	120	R	200
5	-10	120	R	200
6	0	120	R	200
7	10	120	R	80
8	20	1250	H	80
9	20	1250	H	80
10	20	1250	H	80
11	20	1250	H	80

Los materiales se retiraron de los viales y se procesaron en la DSC. Los resultados se muestran en las Figuras 24 y 25. Hubo una endotérmica débil de 60 °C a 100 °C, que probablemente sea pérdida de agua del material durante el calentamiento. Sin embargo, no hubo ninguna fusión cristalina a 166 °C, o exotérmica de recristalización a aproximadamente 110 °C. Esto sugeriría que no solamente es el manitol amorfo de partida, sino que se evita que se cristalice durante el enfriamiento.

Conclusiones

Los datos de la DSC demuestran que DMG evita que el manitol se cristalice durante la liofilización, de modo que conserva una estructura amorfa.

Ejemplo 9

El objetivo de este experimento fue liofilizar antígeno protector recombinante (rPA) en formulaciones que contienen TMG y/o manitol. La actividad del rPA se investigó después por ELISA de competición. El ELISA se llevó a cabo en

muestras antes de la liofilización, después de la liofilización y después de 9 días a +37 °C.

Método

- 5 Se prepararon soluciones como se ha expuesto en la Tabla 14 en tampón de HEPES y con rPA a 100 µg/ml.

Tabla 15

Manitol (M)	TMG (M)
0,548	0
0,548	0,8

- 10 Estas se distribuyeron después en alícuotas en volúmenes de 300 µl en viales, se insertaron parcialmente tapones y se liofilizaron de acuerdo con la receta mostrada en la Tabla 15.

Tabla 16

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Vacío (mTorr)	Variación(R)/ Mantenimiento(H)
1	-45	15	200	H
2	-36	600	300	H
3	-20	120	300	R
4	-10	120	300	R
5	0	120	300	R
6	+10	120	80	R
7	+20	120	80	R
8	+30	1255	80	R
9	+4	1255	80	H

- 15 Se ensayaron muestras líquidas por duplicado por ELISA inmediatamente (muestras prelioofilizadas). Después de la liofilización se reconstituyó un conjunto de muestras de cada formulación de excipientes en 300 µl de agua y se ensayó por ELISA (muestras postlioofilizadas). Se puso un segundo conjunto de muestras liofilizadas de cada condición a +37 °C durante 9 días, después se reconstituyó en 300 µl de agua y se ensayó por ELISA.

- 20 Se recubrió una placa de ELISA con 0,05 µg/ml de rPA. Se valoró la solución de rPA en diluciones de duplicación de 8-0,125 µg/ml, con una concentración constante de mAb de *Bacillus anthracis* (1,5 µg/ml) que permite que la rPA de muestra compita con la rPA unida a placa por la unión de mAb. La placa se exploró después con una HRP específica de IgG de ratón y se desarrolló usando TMB. Se procesó un control de rPA nuevo (descongelado de -80 °C) en todas las placas como un control interno.

- 25 Todos los resultados tomados fueron absorbancia a 450 nm. Se calcularon los valores medios de triplicados o duplicados de cada mezcla de excipiente/rPA. El porcentaje de inhibición por el rPA en solución de la unión del anticuerpo con el rPA en la placa se calculó después y se representó para proporcionar una curva de inhibición. Las curvas de inhibición se compararon entre los 3 puntos temporales para mostrar cambios en la actividad de rPA.

30 Resultados

Los resultados se representan en la Figura 26 (manitol +TMG) y la Figura 27 (solamente manitol). La combinación de TMG y manitol muestra aumento de la capacidad protectora frente al manitol solamente, después de una exposición térmica del rPA liofilizado a +37 °C.

35

Ejemplo 10

- 40 El objetivo de este experimento fue liofilizar antígeno protector recombinante (rPA) en formulaciones que contienen DMG y/o TMG y/o manitol. La actividad del rPA se investigó después por el ELISA de competición. El ELISA se llevó a cabo en muestras antes de la liofilización, después de la liofilización y después de 9 días a +37 °C.

Métodos

Se prepararon soluciones como se expone en Tabla 16 en tampón de HEPES y con rPA a 100 µg/ml.

5

Tabla 17

Numero de muestra	Manitol (M)	DMG (M)	TMG (M)
1	0,548	0,700	0,000
2	0,500	0,700	0,000
3	0,600	0,600	0,650
4	0,548	0,600	0,650
5	0,500	0,600	0,650

Todas las muestras se liofilizaron de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 9.

10 Las muestras se ensayaron pre y post liofilización y se colocó un conjunto duplicado de muestras a +37 °C. Las muestras duplicadas para 3 formulaciones de excipientes también se colocaron a +4 °C y +25 °C para obtener más datos de estabilidad a largo plazo a una diversidad de temperaturas.

Todas las muestras se ensayaron con el ELISA de competición de rPA descrito en el Ejemplo 9.

15 Resultados

Los resultados se representan en las Figuras 26 a 32. Comparados estos con los resultados observados con concentraciones correspondientes de manitol solamente en la Figura 27 y 33 y 34, puede verse que (a) la combinación de DMG y manitol muestra mayor capacidad protectora frente a manitol solamente y (b) la combinación de TMG, DMG y manitol muestra más mejoras adicionales, con muy poca pérdida de actividad de antígeno.

20

Ejemplo 11

25 El objetivo de este experimento fue investigar el efecto de diversos excipientes en el comportamiento de recristalización de manitol.

Métodos

30 Se prepararon soluciones acuosas de DMG y manitol en las concentraciones expuestas en la Tabla 18 a continuación.

Tabla 18

Muestra	DMG (M)	Manitol (M)
1	0,1	0,5
2	0,2	0,5
3	0,3	0,5
4	0,4	0,5
5	0,5	0,5

35 Después estas soluciones se liofilizaron. La liofilización se realizó usando un liofilizador Heto FD 8.0 CD 8030 (Heto Lab equipment Ltd, Reino Unido). Las muestras se pipetearon (1,5 cm³) en viales de cuello reducido de 1,5 ml de vidrio transparente (32 x 11,6 mm). Las muestras se congelaron a (-45 °C) durante dos horas. El secado primario se realizó (-45 °C) durante 15 minutos y se siguió de secado secundario como se detalla en la Tabla 19.

Tabla 19

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Vacío
-38	30	Sí
-37	1.200	Sí
-34	1.200	Sí
-20	120	Sí
-10	120	Sí
0	120	Sí
10	120	Sí
20	120	Sí
30	1.255	Sí
4	4.800	Sí
35	1.000	No

Además, se liofilizaron también soluciones acuosas de (i) manitol 0,5 M y glicina 0,5 M [Muestra 6] y (ii) manitol 0,5 M y sarcosina 0,5 M [Muestra 7] de acuerdo con el protocolo anterior, para permitir una comparación con la Muestra 5.

Las muestras se analizaron después por calorimetría de exploración diferencial (DSC) usando un sistema de análisis térmico TA serie Q-2.000 (TA Instruments Ltd, Reino Unido). Se empleó una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y una velocidad de enfriamiento de 30 °C/min.

Además, se tomó una imagen por microscopio electrónico de barrido (MEB) para la muestra liofilizada 5. Esta se representa en la Figura 39.

Resultados

Se representan las trazas de DSC para las muestras 1 a 5 en la Figura 35. Para comparación, la traza de DSC para manitol solamente se representa en la Figura 36. La traza superior en la Figura 36 muestra que el manitol se recristaliza fácilmente (traza superior) al enfriar después del calentamiento inicial y no cambia su forma polimórfica tras recalentar.

Los resultados de DSC en la Figura 35 muestran que a medida que aumenta la concentración de DMG, se reduce la recristalización de manitol. El pico de recristalización de manitol en el ciclo de enfriamiento no es detectable a concentraciones de DMG 0,3 M y superiores. La Figura 37 muestra la traza para manitol 0,5 M/DMG 0,5 M (Muestra 5) en más detalle.

Los resultados de DSC en la Figura 38 comparan las muestras 5, 6 y 7. Estos resultados muestran que DMG es más eficaz que la sarcosina o la glicina a las concentraciones ensayadas en la prevención de la recristalización de manitol.

Tabla 20

Concentración (M)	Aparición de la temperatura de transición de vidrio promedio en el segundo ciclo de calentamiento (n=3) / °C		
	DMG	Sarcosina	Glicina
0	Cristalina	Cristalina	Cristalina
0,1	Cristalina	Cristalina	Cristalina
0,2	11,99	Cristalina	Cristalina
0,3	12,24	11,56	Cristalina
0,4	13,14	12,46	Cristalina
0,5	13,81	12,65	11,51

Estos resultados muestran que en todos los casos la temperatura de transición de vidrio de manitol aumenta con el aumento de la concentración del excipiente, y que DMG es más eficaz a estas concentraciones que sarcosina o glicina.

REIVINDICACIONES

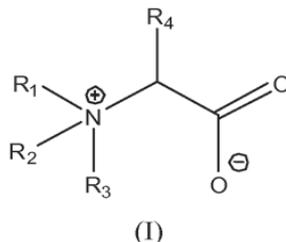
1. Un método para conservar un polipéptido que comprende:

5 (a) proporcionar una solución acuosa de:

(i) el polipéptido,

(ii) uno o más azúcares en los que la concentración de azúcar, o la concentración de azúcar total, es de 0,05 M a 3 M, y

10 (iii) de 0,001 M a 2,5 M de un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo:

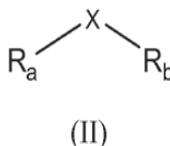


15 en la que R_1 representa hidrógeno o alquilo C_{1-4} , R_2 representa hidrógeno o alquilo C_{1-4} , R_3 representa alquilo C_{1-4} y R_4 representa hidrógeno;

y/o

de 0,001 M a 2,5 M de un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo:

20



en la que X representa $-S(O)_2-$ y R_a y R_b representan de forma independiente alquilo C_{1-4} ; y

25

(b) liofilizar la solución para formar una composición que incorpora el polipéptido.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución acuosa comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo.

30

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución acuosa comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo y un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo.

35

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, el compuesto de fórmula (I) es dimetilglicina o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo.

40

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto de fórmula (II) es dimetilsulfona.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que (a) la concentración del compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo es de 0,01 a 1,5 M o de 0,1 M a 1 M o de 0,3 M a 0,7M, y/o (b) la concentración del compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo es de 0,01 a 1,5 M o de 0,1 M a 1 M o de 0,3 M a 0,7 M, y/o (c) la concentración de azúcar, o la concentración de azúcar total, es de 0,05 M a 2 M o de 0,05 a 1 M.

45

7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que (a) el o los azúcares comprenden un azúcar o alcohol de azúcar no reductor y/o (b) se usan dos o más azúcares y uno de los azúcares es sacarosa, y/o (c) se usan dos o más azúcares, uno de los azúcares es sacarosa y la relación de concentración de sacarosa en relación con el otro azúcar o los otros azúcares es de 1:1 a 20:1.

50

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7 (b) o (c) en el que el otro azúcar es rafinosa.

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que está presente un azúcar que es manitol.
- 5 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que (a) la solución acuosa está liofilizada en viales o ampollas que después se sellan opcionalmente.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el polipéptido es:
- 10 (a) una hormona, un factor de crecimiento, un péptido o una citocina;
 (b) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o ligando del mismo;
 (c) una oxidoreductasa, una transferasa, una hidrolasa, una liasa, una isomerasa o una ligasa; o
 (d) un inmunógeno de vacuna.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el polipéptido es:
- 15 (i) un péptido de taquiquinina, un péptido vasoactivo intestinal, un péptido relacionado con un polipéptido pancreático, un péptido opioide o un péptido de calcitonina;
 (ii) un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo;
 (iii) un anticuerpo quimérico, humanizado o humano, o fragmento del mismo
- 20 (iv) una oxidoreductasa, una transferasa, una hidrolasa, una liasa, una isomerasa o una ligasa; o
 (v) una proteína, glucoproteína o lipoproteína vírica o bacteriana de longitud completa; o un fragmento de la misma.
13. Un método para preparar una vacuna que incorpora una vacuna, comprendiendo dicho método:
- 25 (a) proporcionar una solución acuosa de (i) un inmunógeno de vacuna como se define en la reivindicación 11 o 12, (ii) de 0,001 M a 2,5 M de un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo como se define en la reivindicación 1 o 4, y/o de 0,001 M a 2,5 M de un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo como se define en la reivindicación 1 o 5 y (iii) uno o más
- 30 azúcares en los que la concentración de azúcar, o la concentración de azúcar total, es de 0,05 M a 3 M; y
 (b) opcionalmente añadir un adyuvante, tampón, antibiótico y/o aditivo a la mezcla; y
 (c) liofilizar la solución para formar una composición o composición sólida que incorpora dicho inmunógeno de vacuna.
- 35 14. Una composición que puede obtenerse por un método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicha composición es una matriz sólida, liofilizada, que incorpora el polipéptido o inmunógeno de vacuna.
- 40 15. Uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo como se define en la reivindicación 1 o 4 a una concentración de 0,001 M a 2,5 M y/o un compuesto de fórmula (II) o una sal o un éster fisiológicamente aceptable del mismo como se define en la reivindicación 1 o 5 a una concentración de 0,001 M a 2,5 M y uno o más azúcares en los que la concentración de azúcar, o concentración de azúcar total, es de 0,05 M a 3 M, para conservar un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 11 o 12 durante la liofilización.
- 45

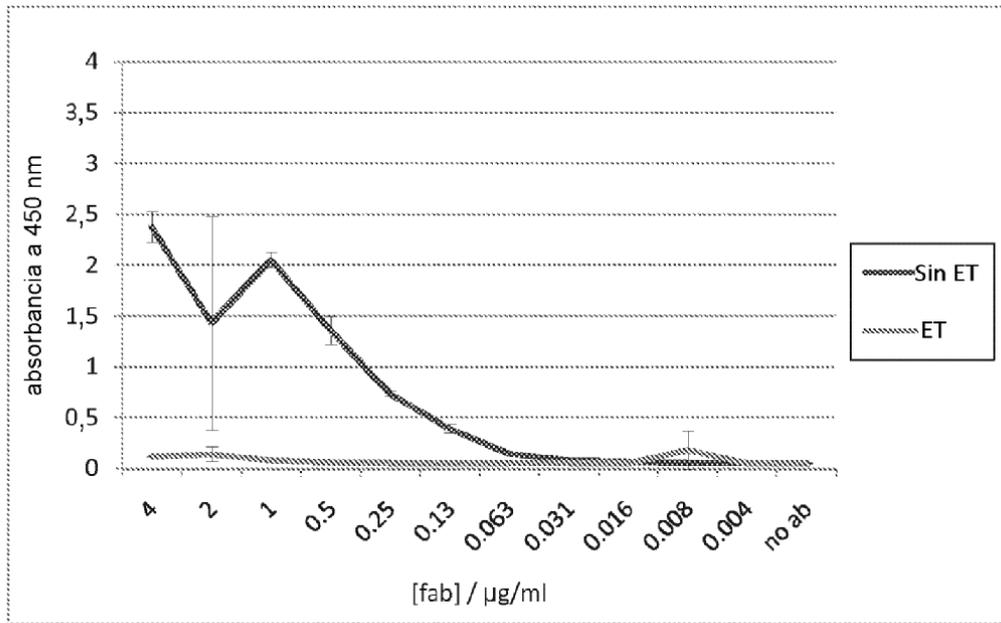


Figura 1

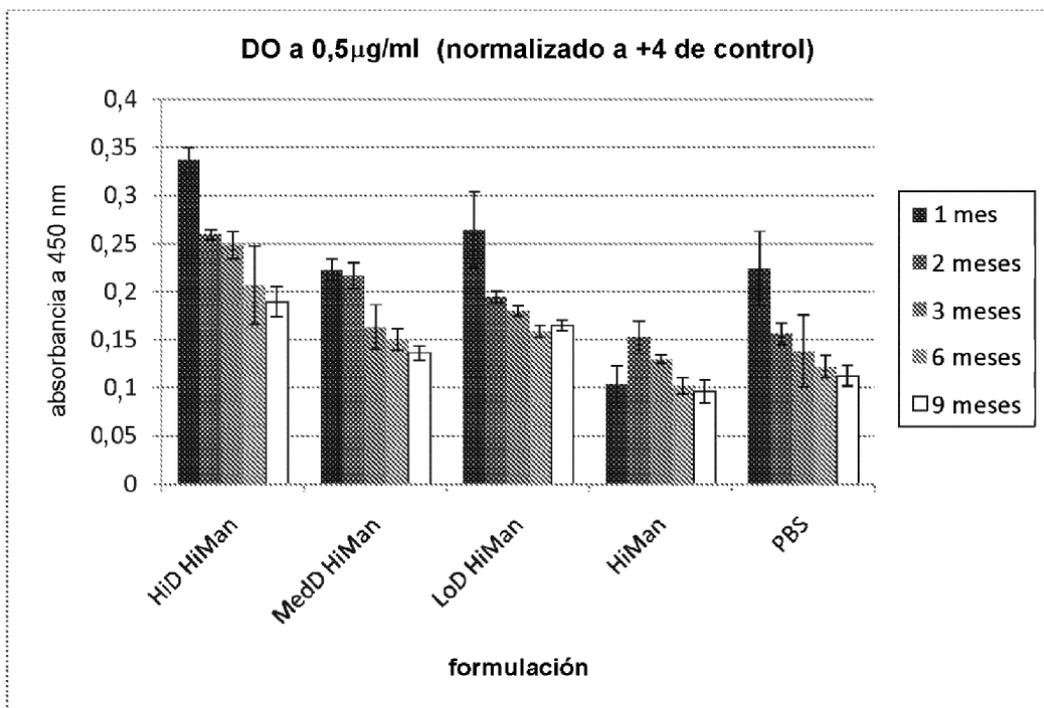


Figura 2

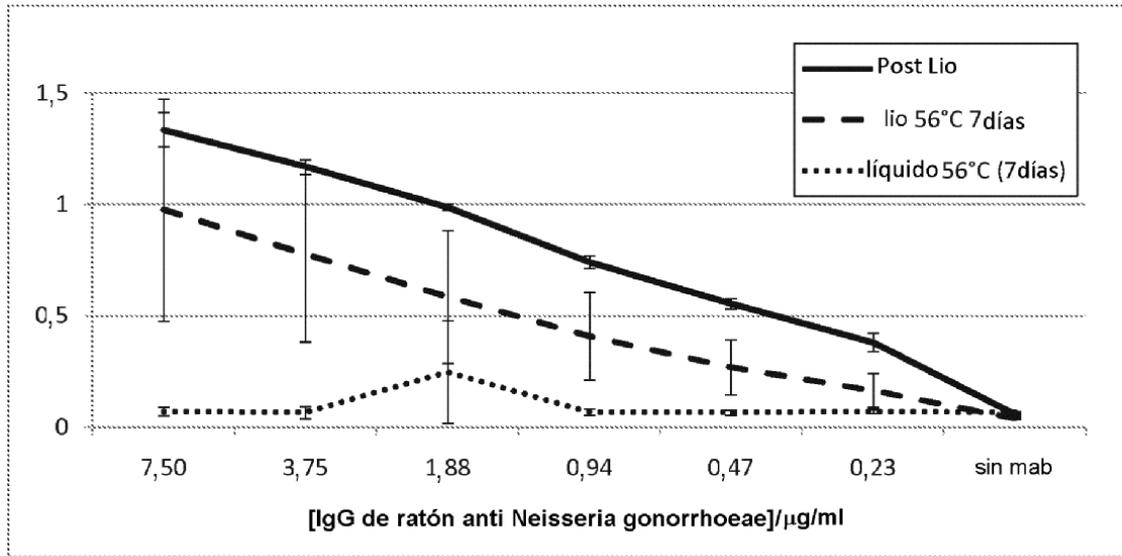


Figura 3

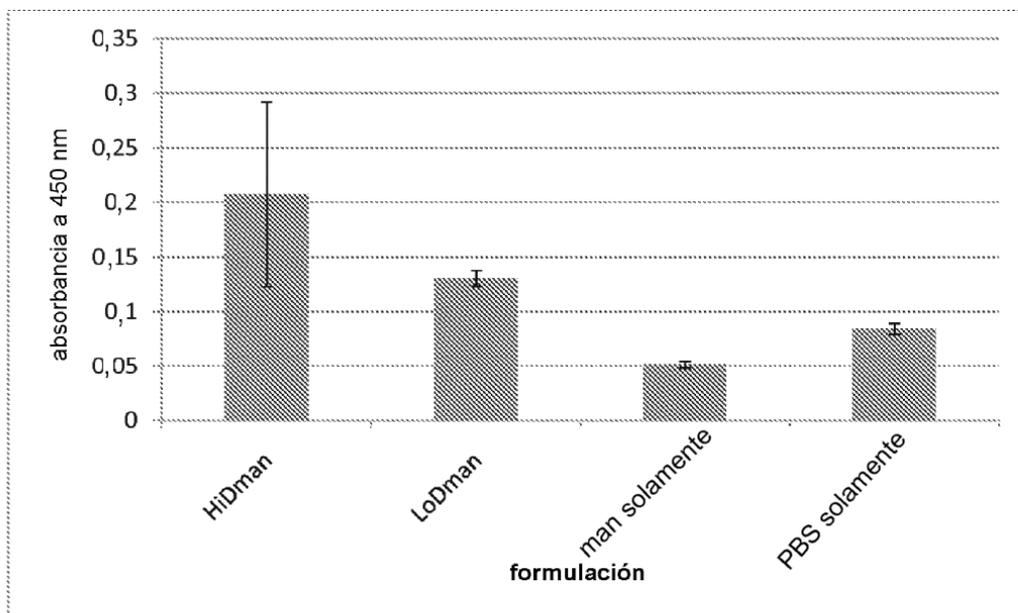


Figura 4

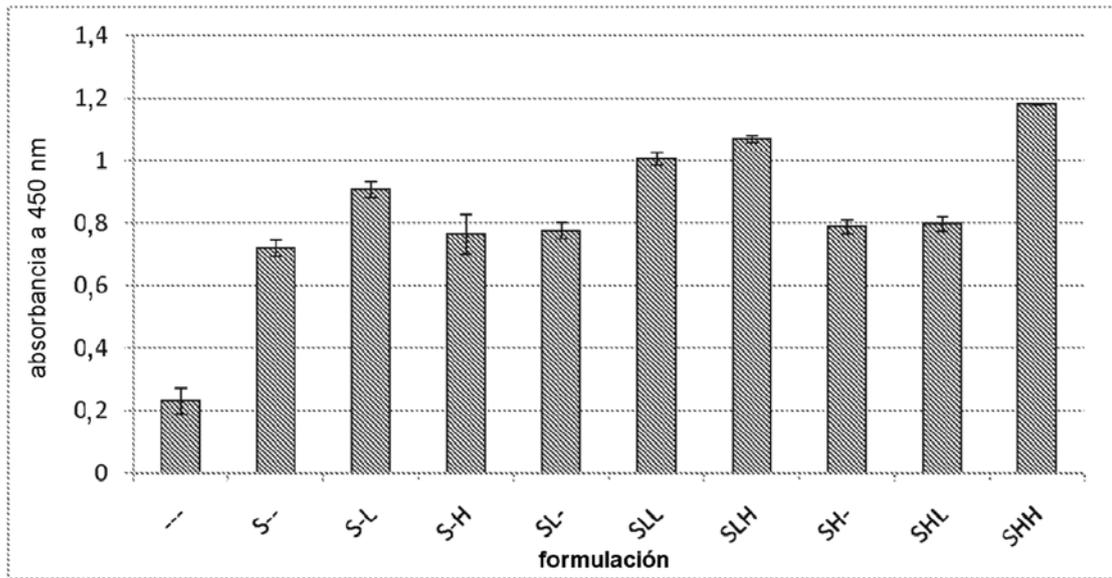


Figura 5

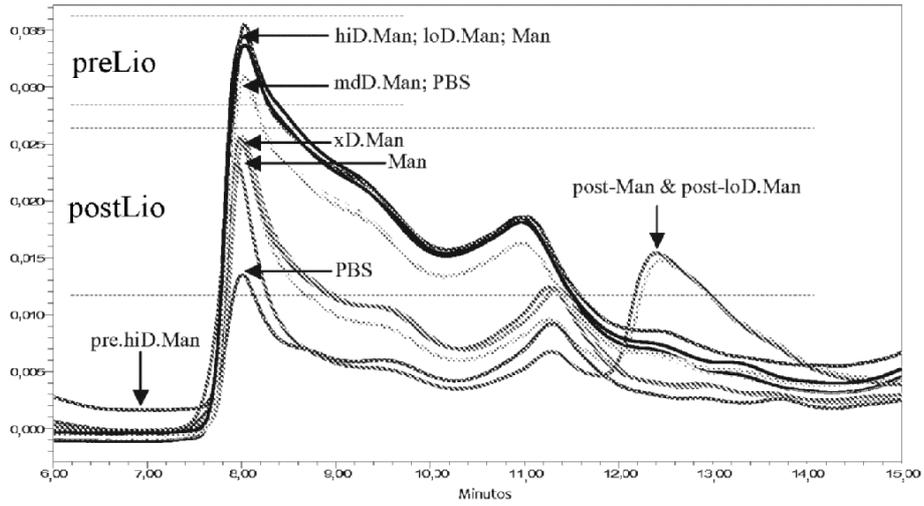


Figura 6

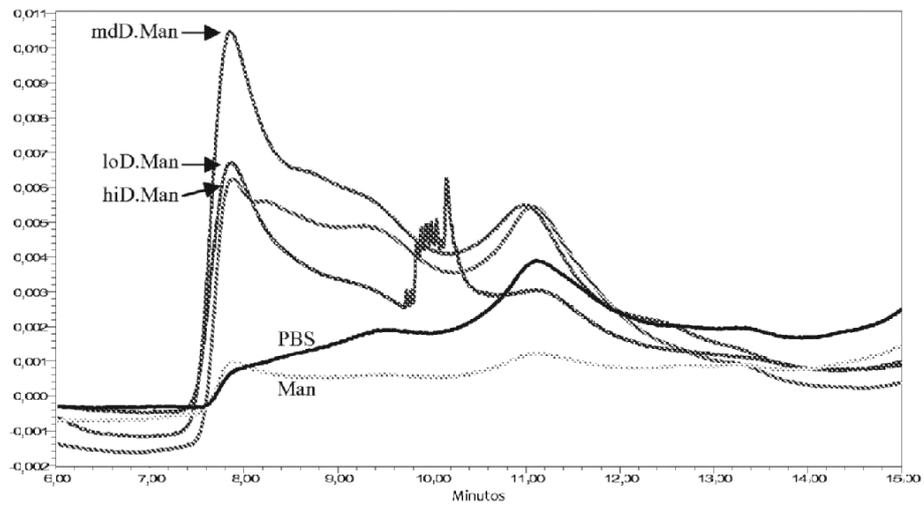


Figura 7

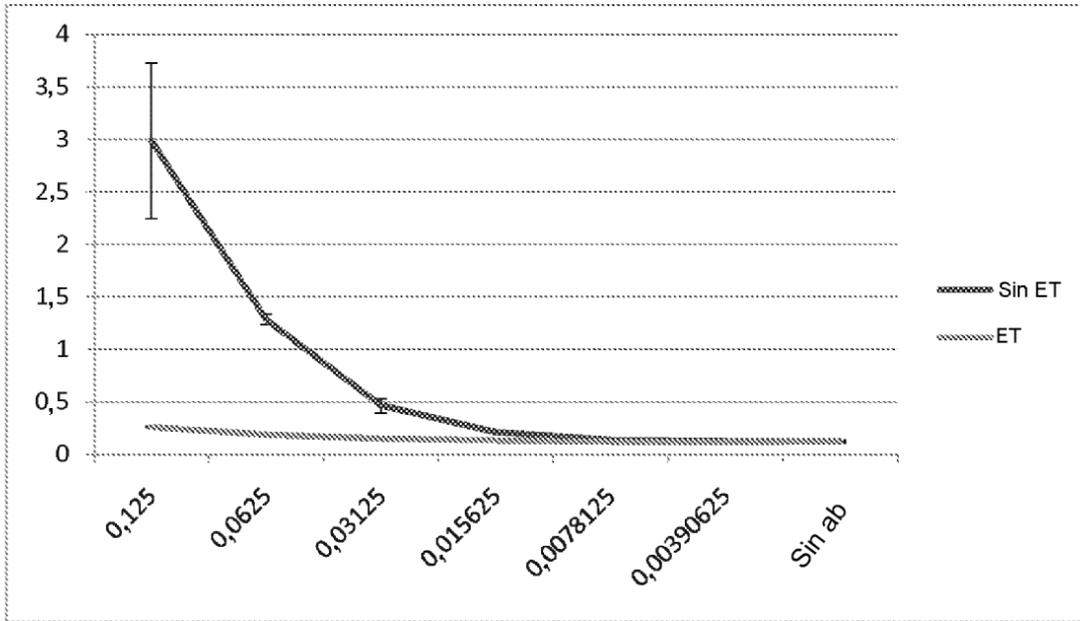


Figura 8

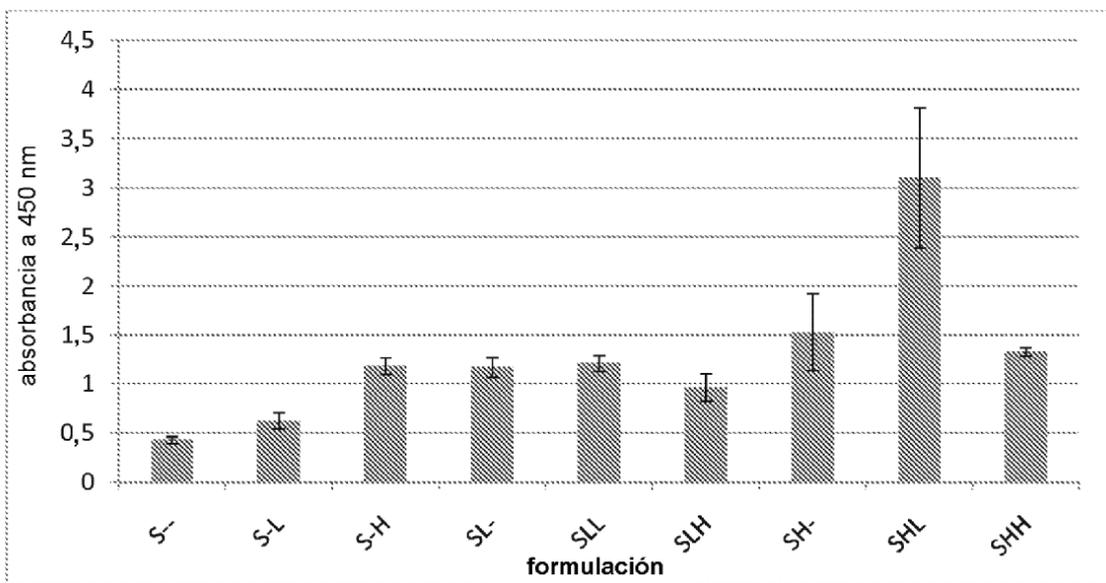


Figura 9

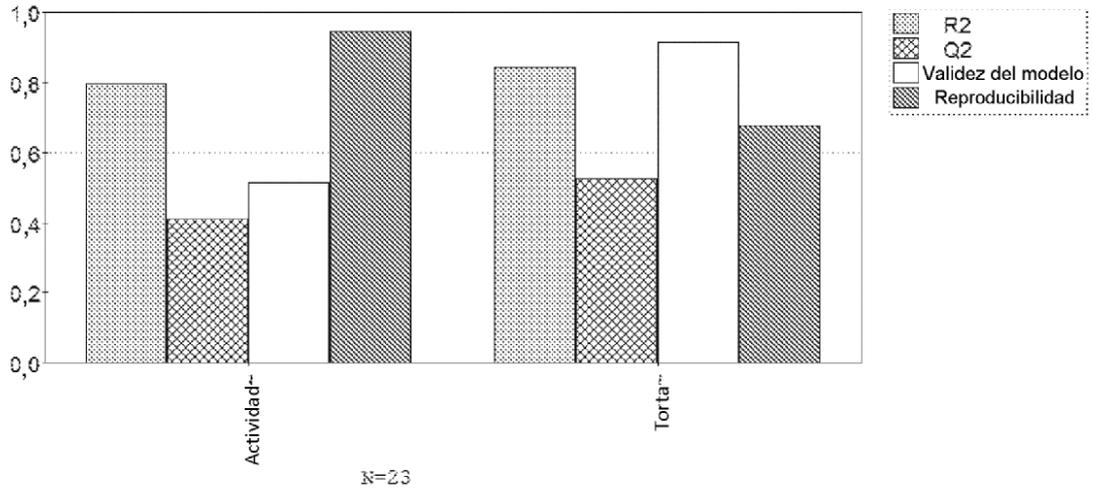


Figura 10

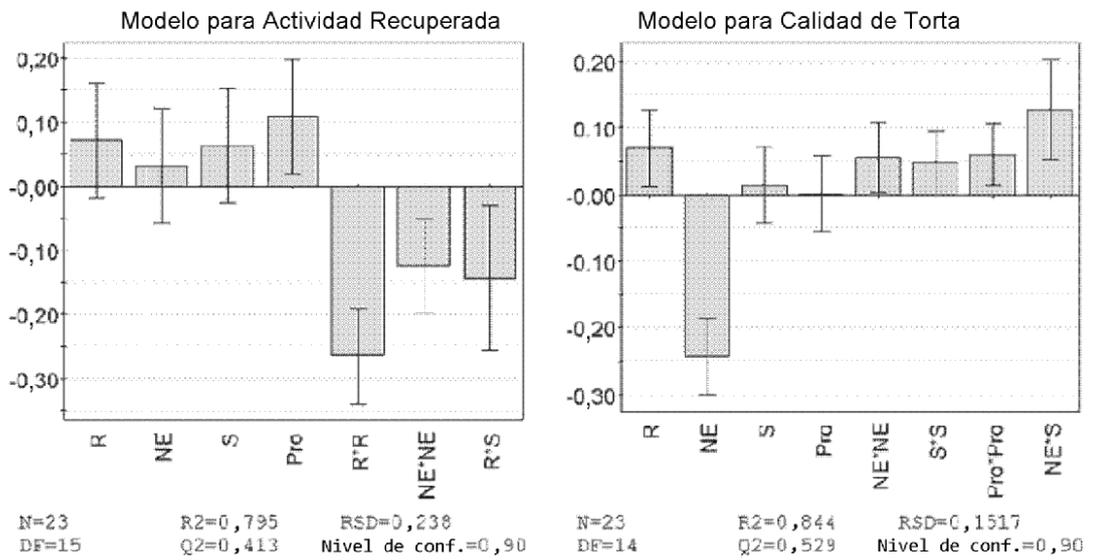


Figura 11

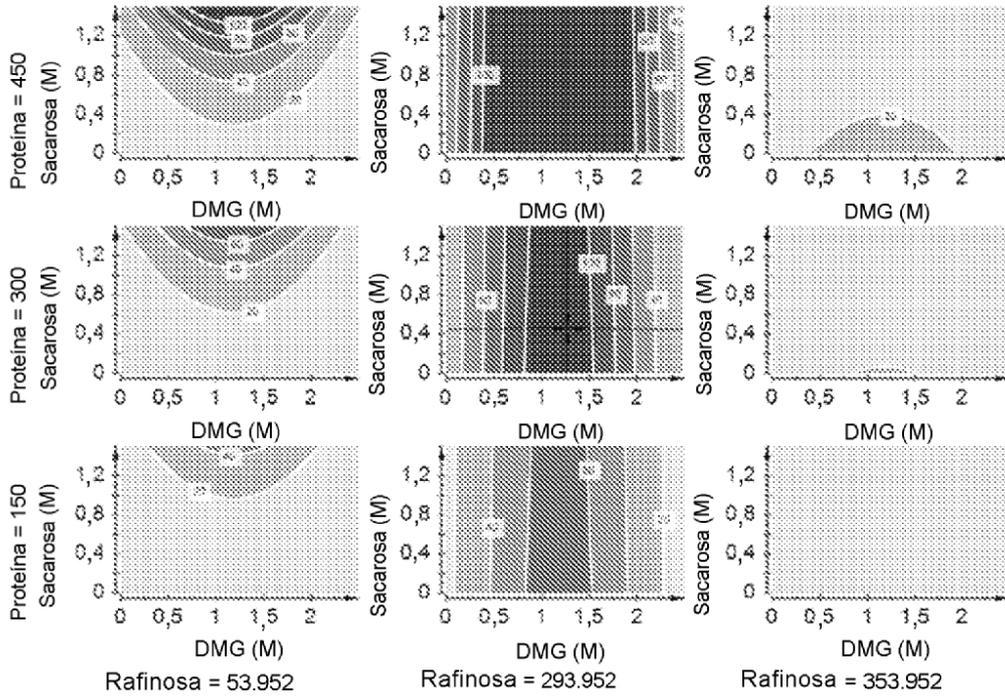


Figura 12

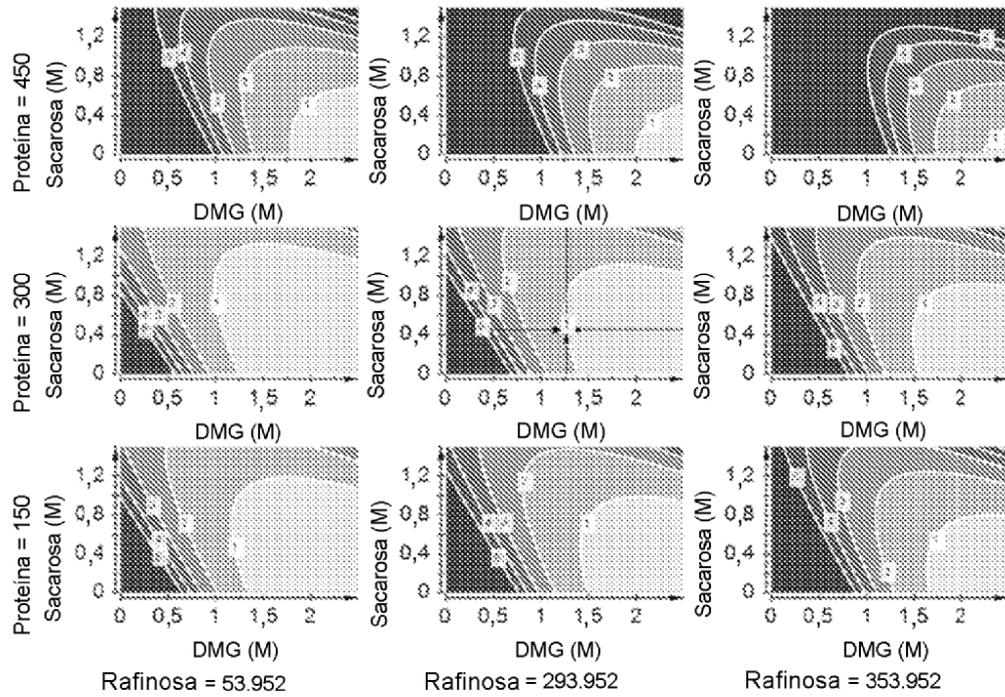


Figura 13

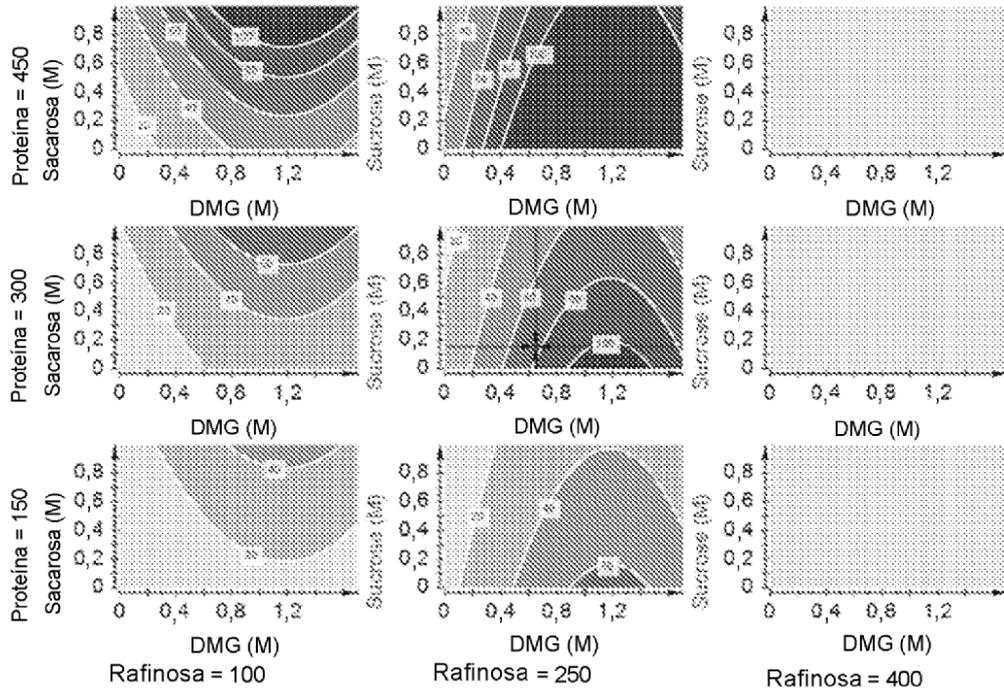


Figura 14

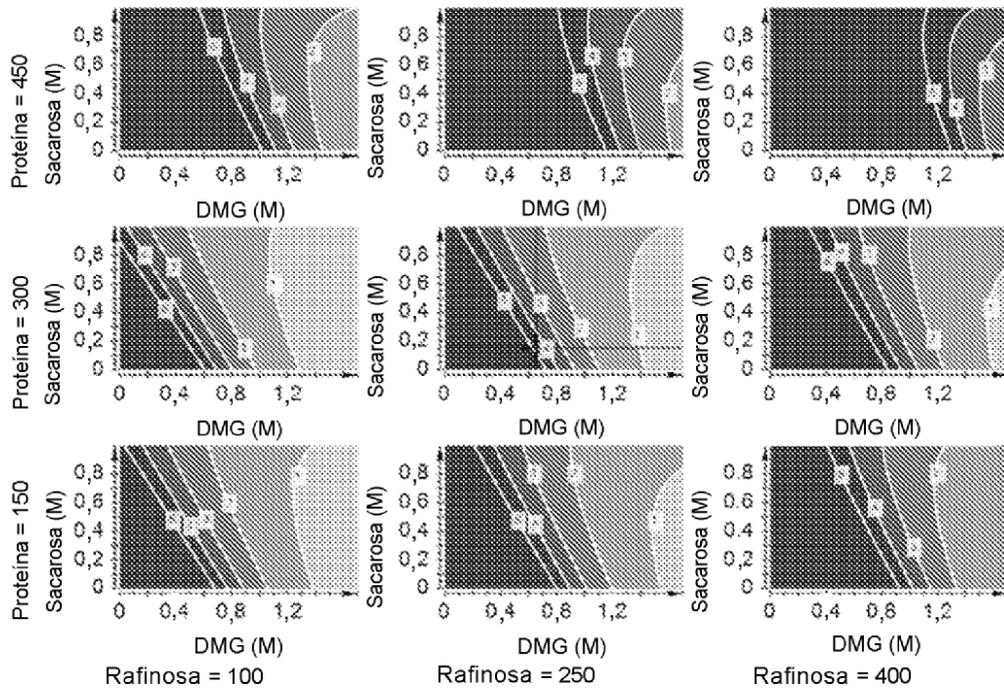


Figura 15

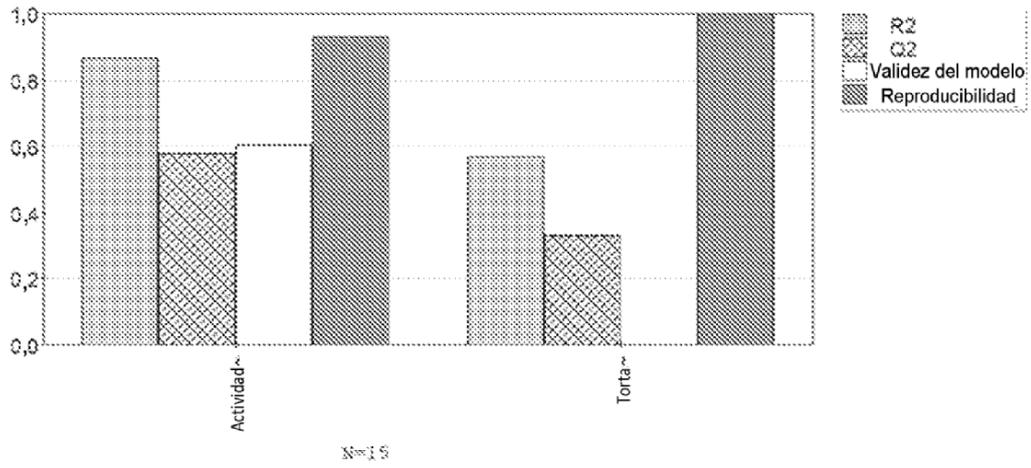


Figura 16

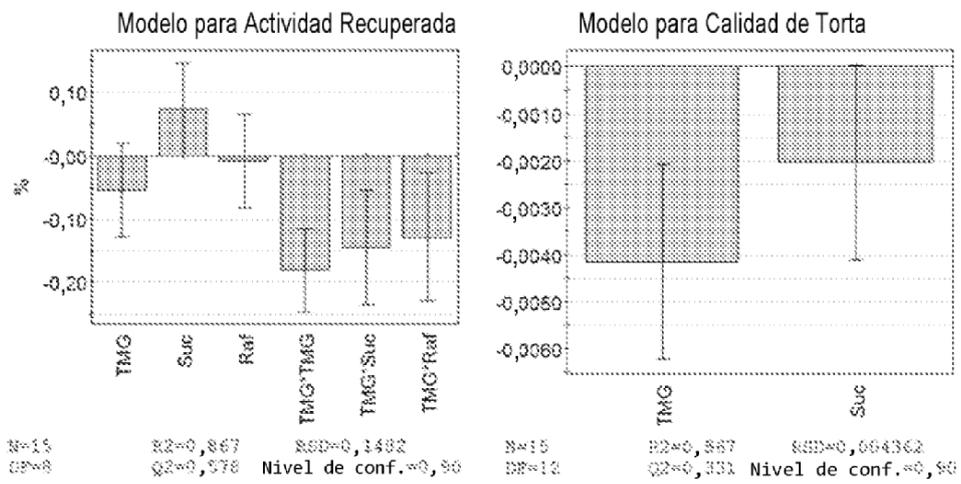


Figura 17

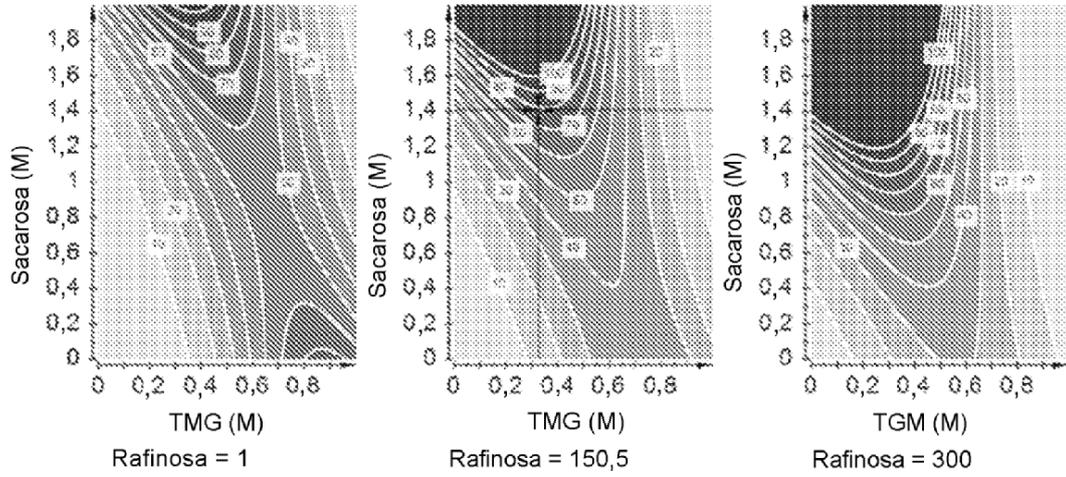


Figura 18

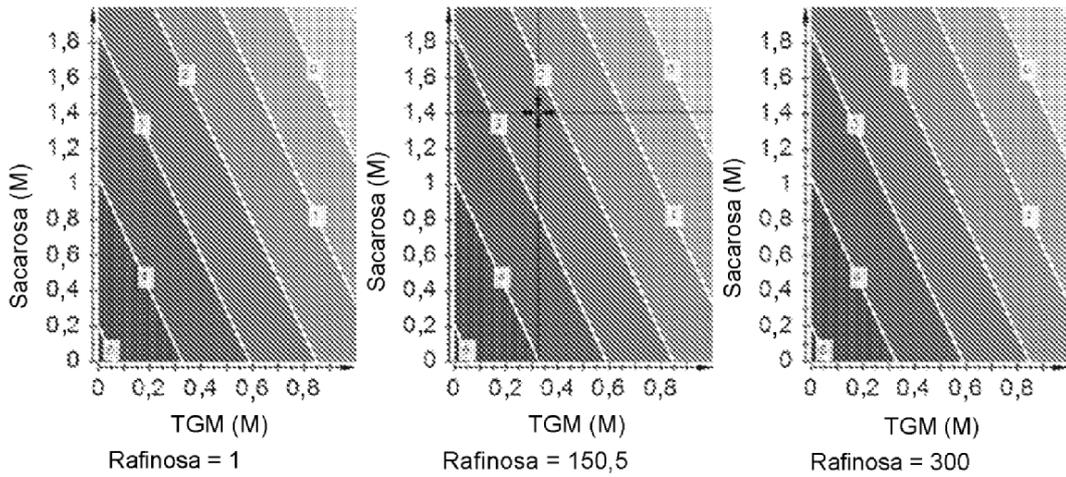


Figura 19

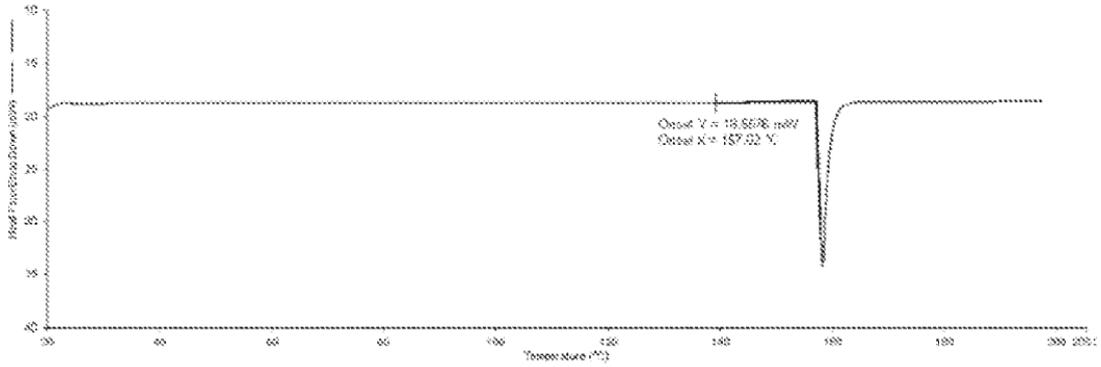


Figura 20

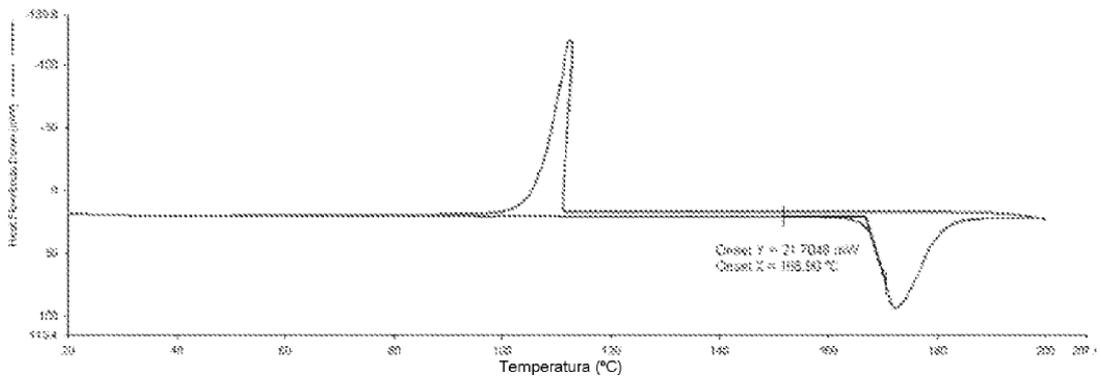


Figura 21

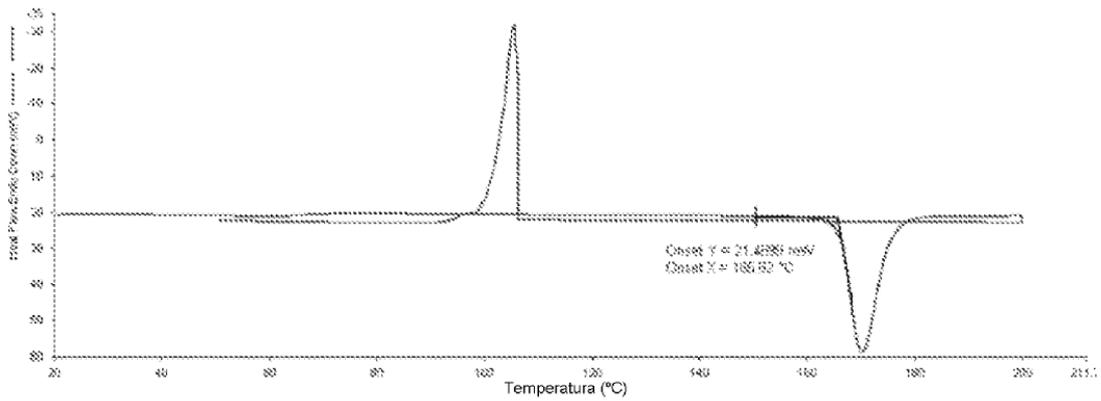


Figura 22

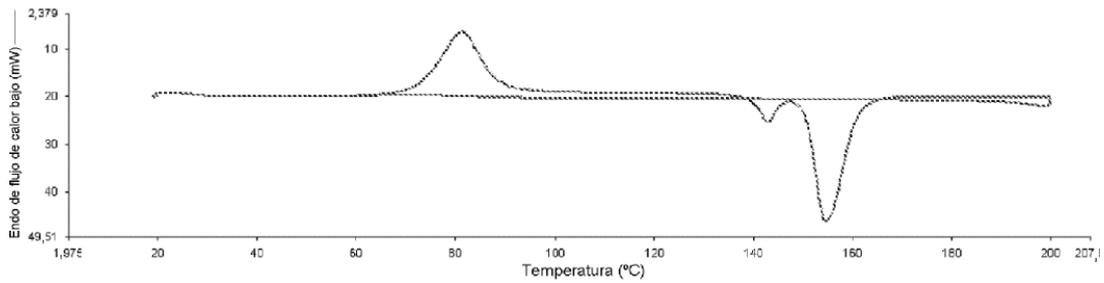


Figura 23

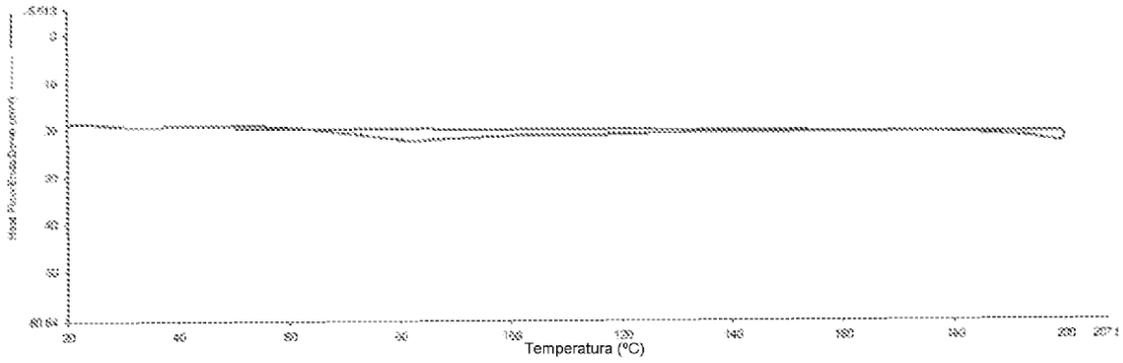


Figura 24

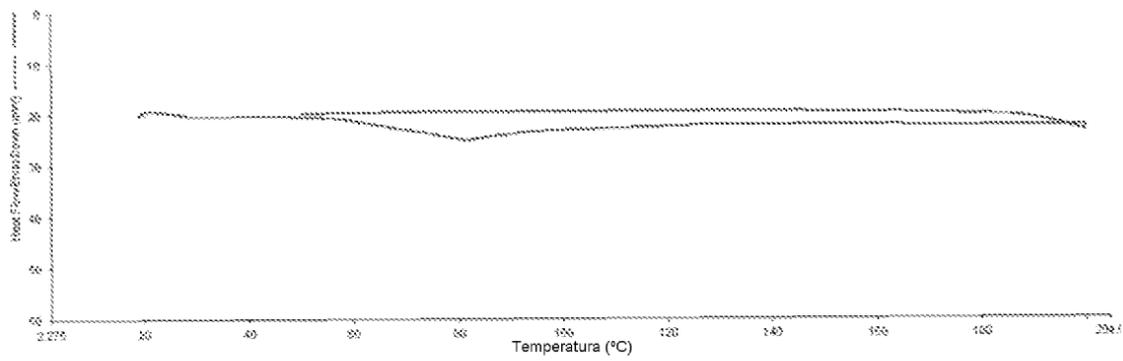


Figura 25

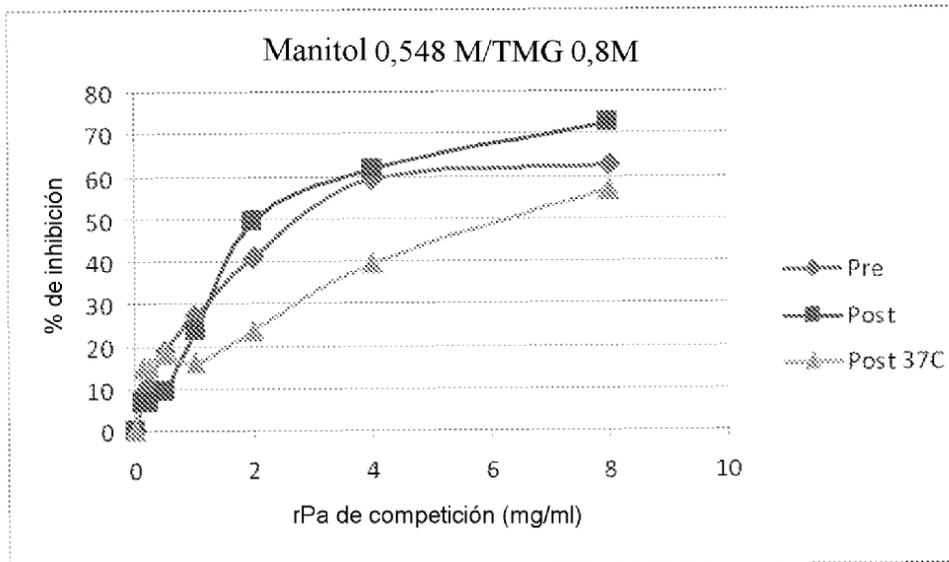


Figura 26

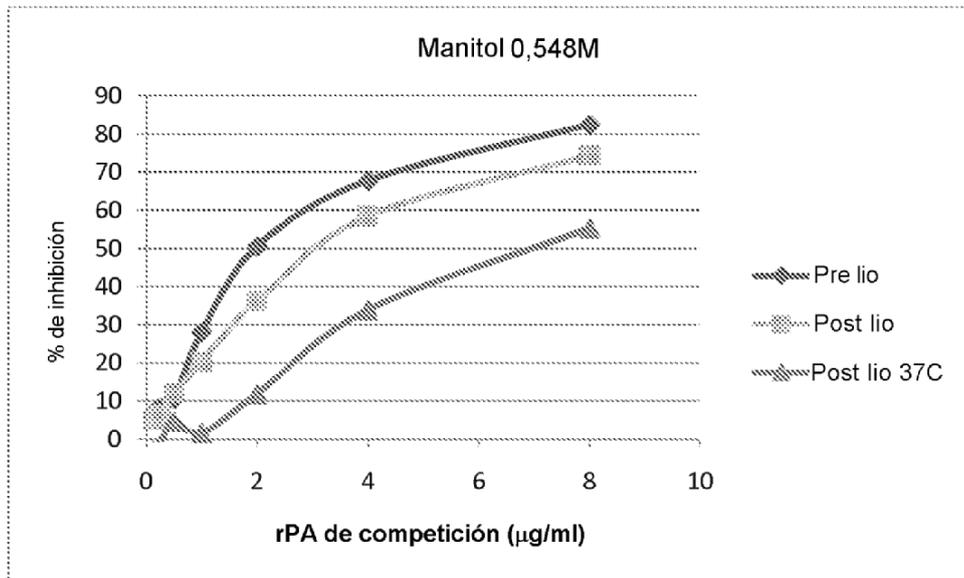


Figura 27

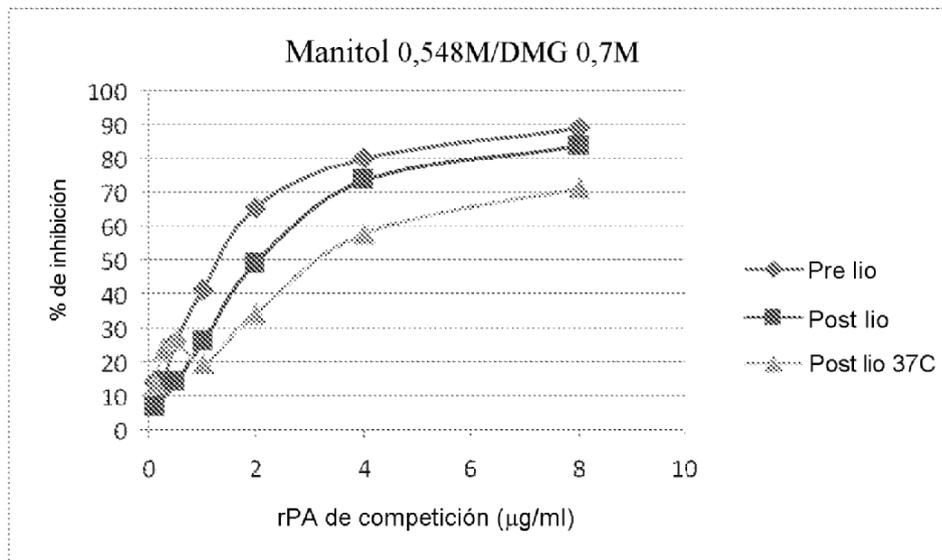


Figura 28

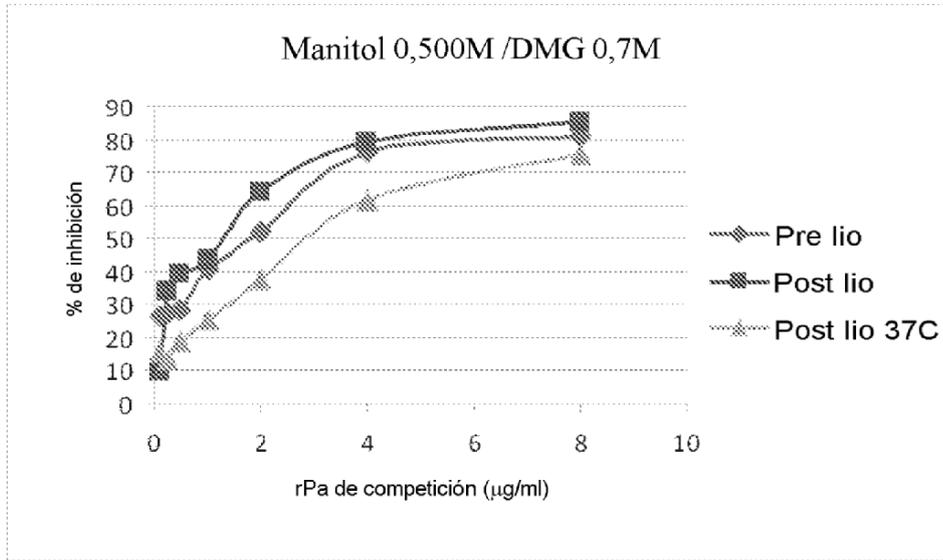


Figura 29

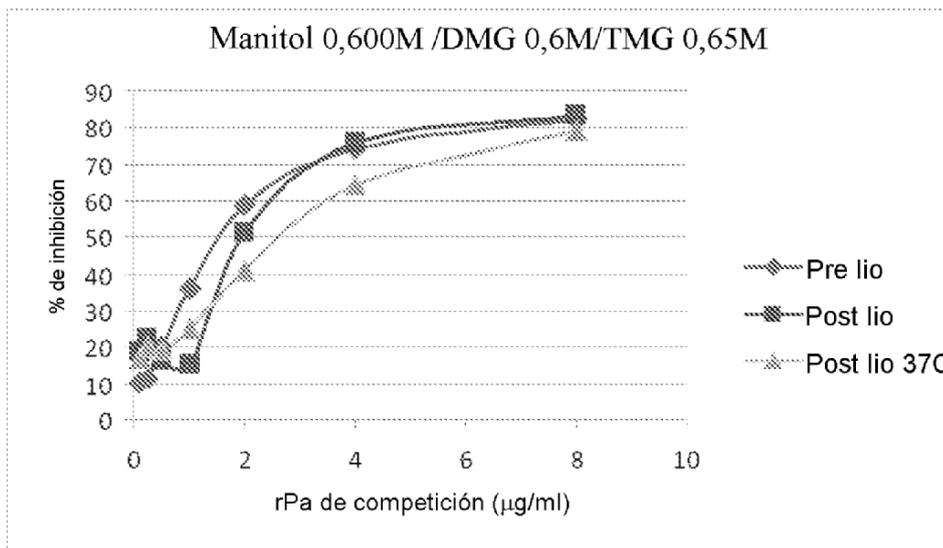


Figura 30

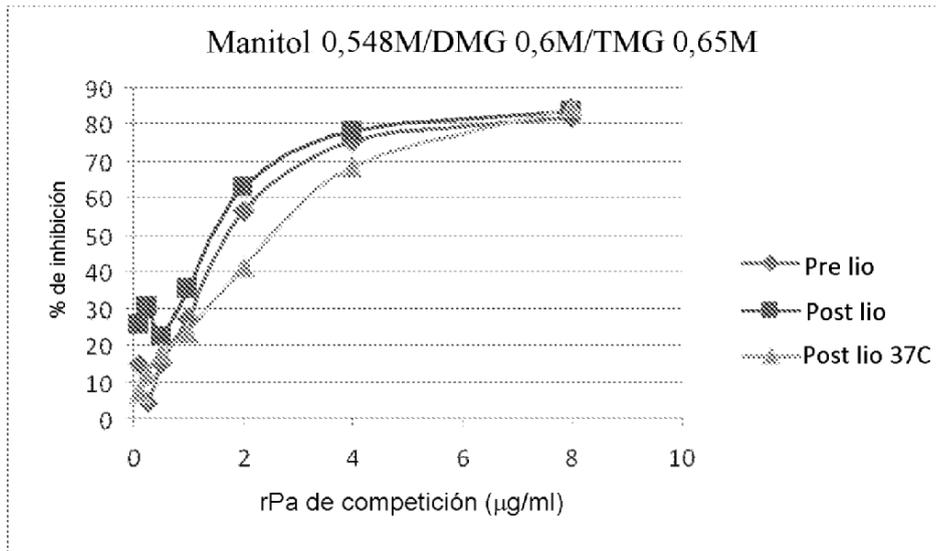


Figura 31

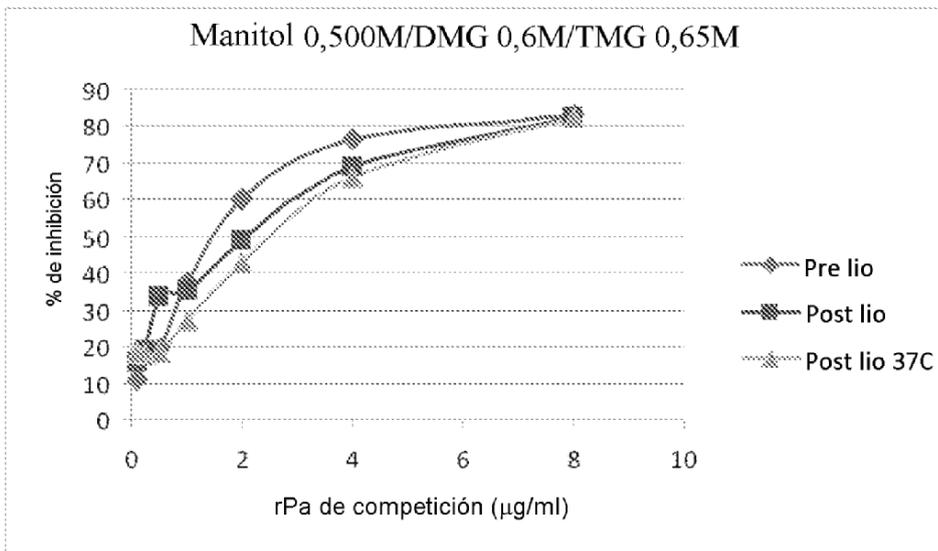


Figura 32

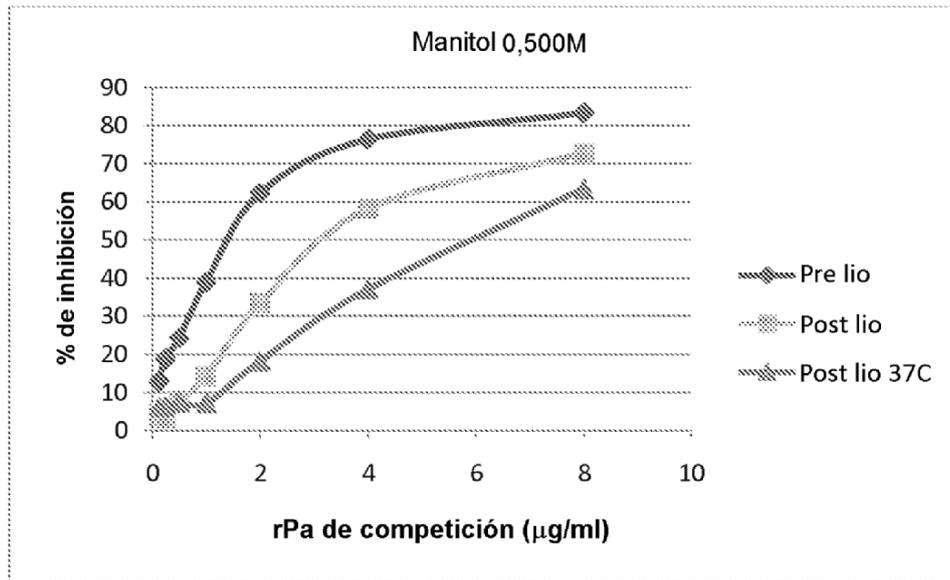


Figura 33

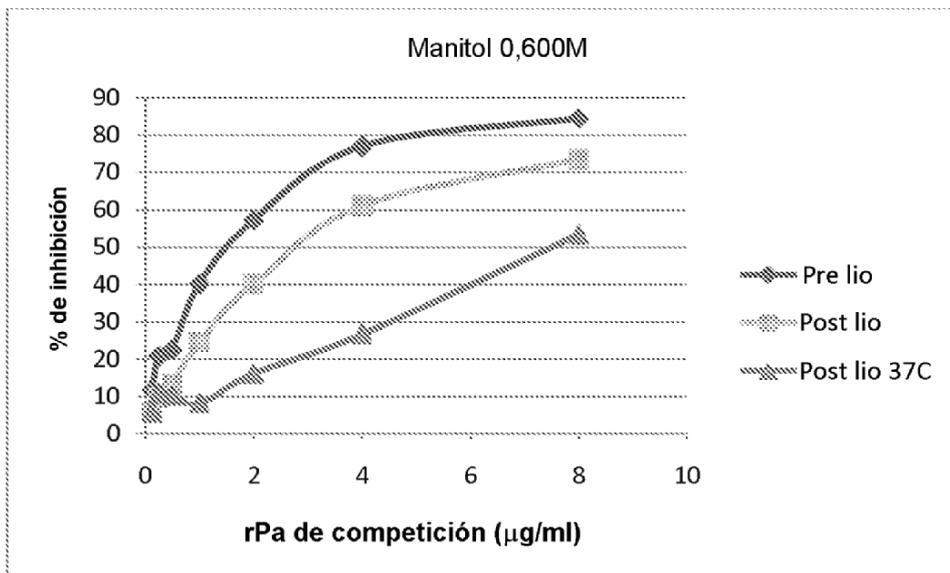


Figura 34

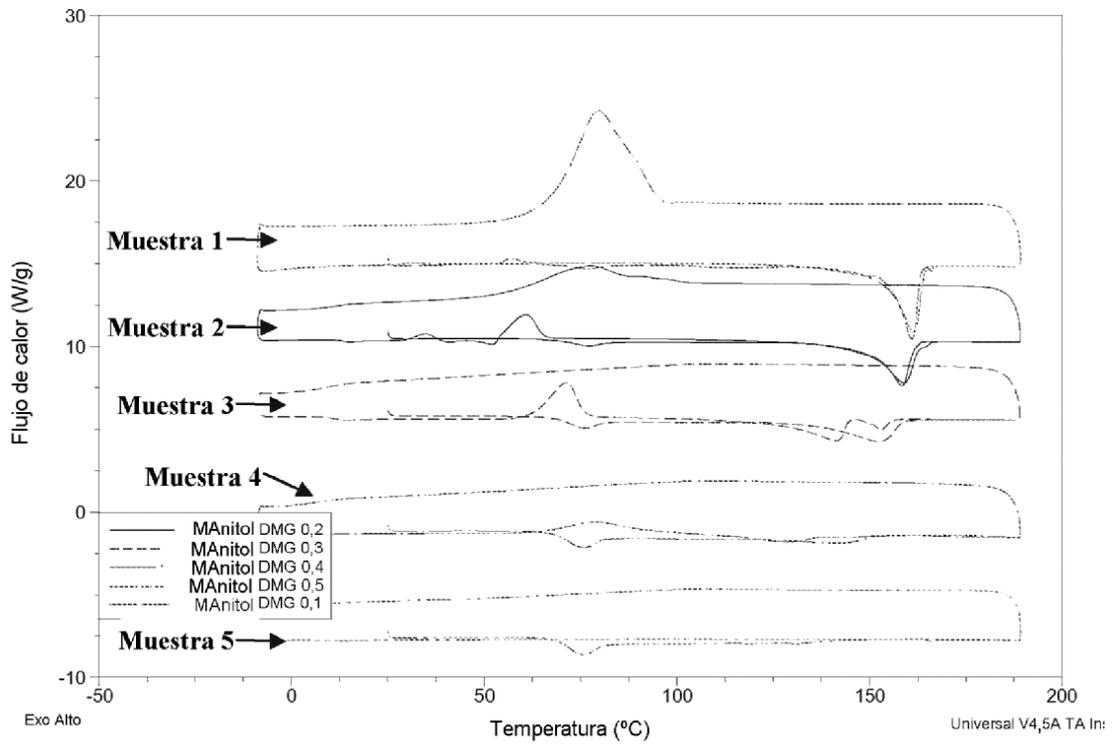


Figura 35

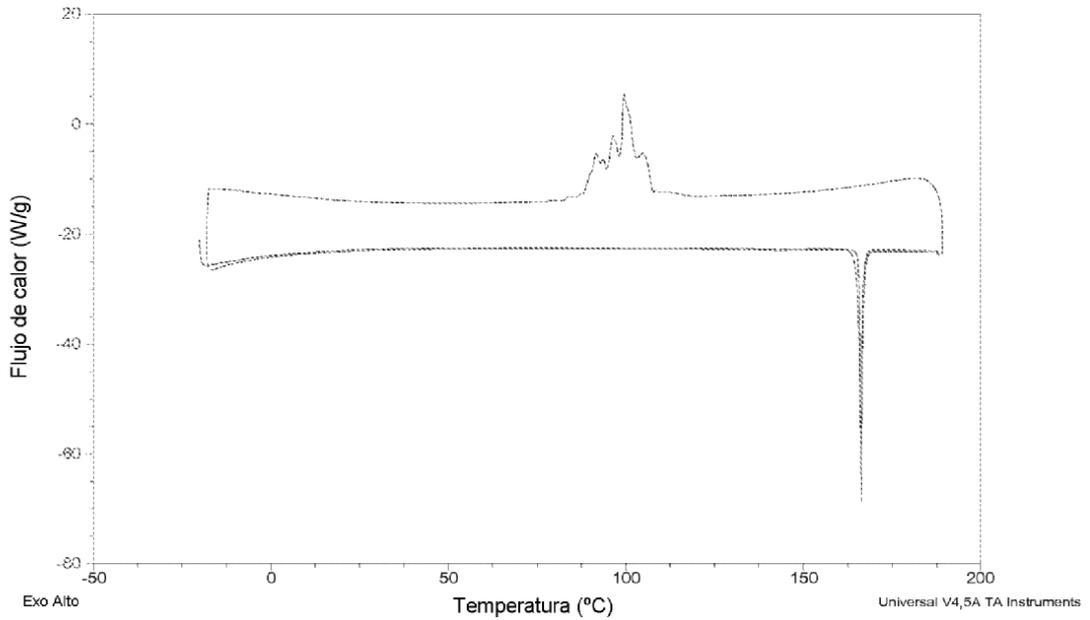


Figura 36

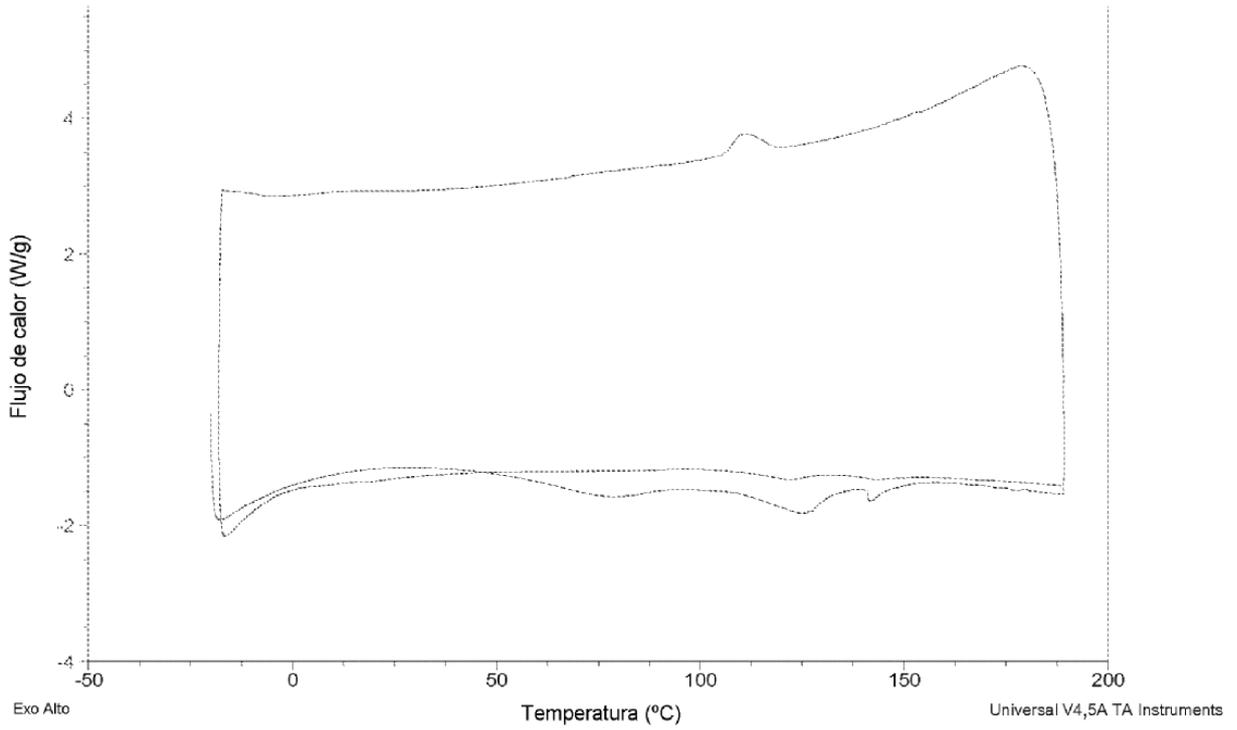


Figura 37

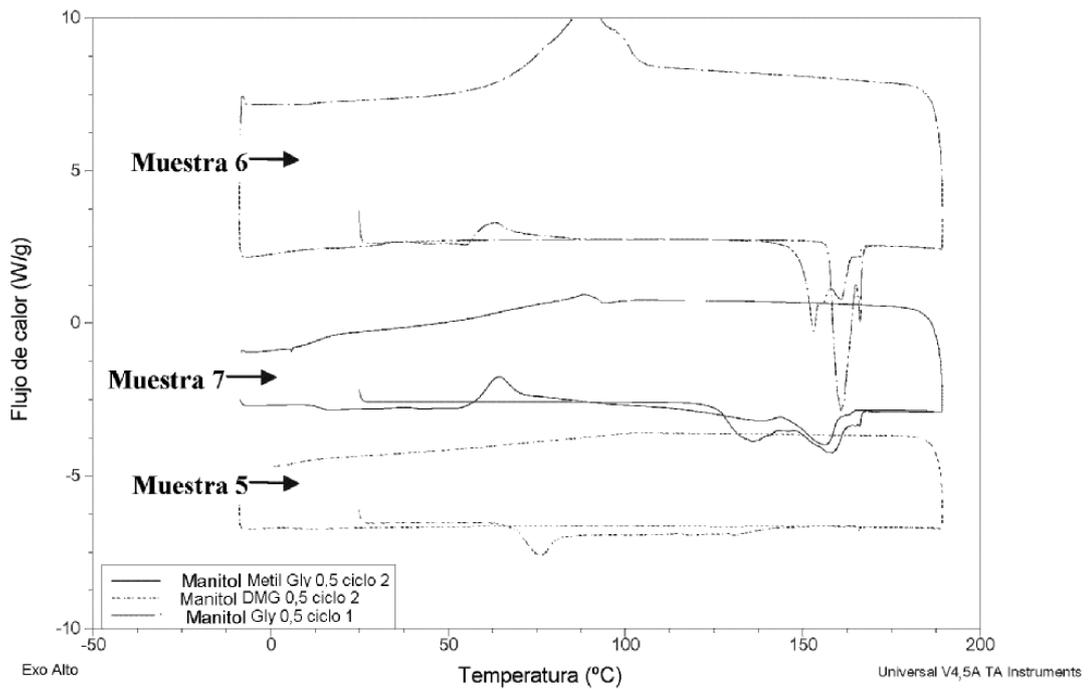


Figura 38

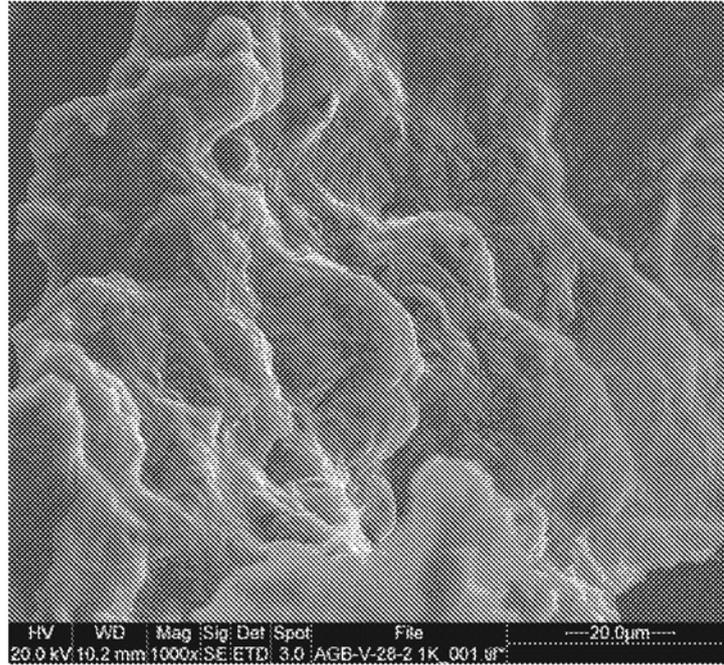


Figura 39