

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 139**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**A01N 1/02** (2006.01)

**A61K 35/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2011 PCT/IB2011/050655**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11101796**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2011 E 11744341 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2537030**

54 Título: **Una composición farmacéutica de células muertas con inmunogenicidad sustancialmente retenida**

30 Prioridad:

**19.02.2010 IN 464MU2010**

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

**28.12.2017**

73 Titular/es:

**CADILA PHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)  
"Cadila Corporate Campus"  
Sarkhej-Dholka Road Bhat  
Ahmedabad 382 210 GUJ, IN**

72 Inventor/es:

**KHAMAR, BAKULESH MAFATLAL;  
SINGH, SATINDER;  
DESAI, NIRAV MANOJKUMAR y  
MODI, RAJIV INDRAVADAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 648 139 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

Una composición farmacéutica de células muertas con inmunogenicidad sustancialmente retenida

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención revela un proceso de preparación de una composición farmacéutica de células completas muertas con inmunogenicidad sustancialmente retenida.

## 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La preparación de vacunas a partir de un único antígeno o biomarcador tiene una inmunogenicidad limitada para proporcionar la inmunidad protectora deseada/requerida. Para lograr una protección de amplio espectro, se requiere una combinación/repertorio de antígenos. Tal combinación es posible mediante el uso de células completas ya que comprenden diferentes marcadores inmunogénicos y antígenos.

15 Las células cancerosas si se usan vivas como vacunas pueden causar crecimiento canceroso y pueden embeber la enfermedad. El uso de células muertas ha sido restringido debido a su limitada estabilidad. Existe una demanda persistente para estabilizar las células muertas mientras se conservan sus propiedades inmunológicas y estructurales. Aunque varios esfuerzos para preservar las células vivas están bien documentados, a nuestro entender no hay informes disponibles sobre la preservación de células muertas con la retención de sus propiedades inmunológicas con fines de inmunización.

20 Las células completas cuando se usan como vacunas generan una mejor respuesta inmune cuando se comparan con lisados celulares lo que se atribuye al repertorio de epítomos inmunogénicos, caracterizados o no caracterizados, en la superficie celular.

25 Hardev S. Pandha, Dorthe Cook, Rebecca Greenhalgh y Angus Dalgleish describieron el uso de células muertas (2005 BJU INTERNATIONAL, 95, 1336-1343) para la inmunoterapia del cáncer de próstata murino. La inmunogenicidad de las células tumorales irradiadas se potencia cuando se destruyen ex vivo usando la terapia con genes suicidas.

30 El adyuvante es un agente que puede estimular el sistema inmune y aumentar la respuesta a una vacuna, sin tener ningún efecto antigénico específico en sí mismo (NCI, Definición). La palabra "adyuvante" proviene de la palabra latina *adiuvare*, que significa auxiliar o ayudar. "Un adyuvante inmunológico se define como cualquier sustancia que actúa para acelerar, prolongar o mejorar las respuestas inmunes específicas del antígeno cuando se usa en combinación con antígenos específicos de vacunas" (DNA Vaccines: Methods and Protocols, D.B. Lowrie and R.G. Whalen, Humana Press, 2000).

35 Hay muchos adyuvantes conocidos de uso generalizado, que incluyen aceites, sales de aluminio y virosomas, organismos completos vivos o muertos y extractos de microbios. El uso de estos adyuvantes también se recomienda en las vacunas contra el cáncer para aumentar la estimulación inmune por un antígeno o antígenos.

40 La patente de Estados Unidos No. 5.059.518 divulga el método de preservación de líneas celulares de hibridoma vivo, células de tejido y células de control para inmunoensayos y mediciones hematológicas. El método comprende el aislamiento de linfocitos de sangre periférica, la resuspensión del sedimento celular en albúmina regulada con fosfato y el tratamiento de células con solución isotónica de trehalosa como crioprotector intracelular seguido de liofilización. Los liofilizados se resuspendieron en solución de trehalosa isotónica. Se usó el clasificador de células marcado con anticuerpos fluorescentes (FACS) para caracterizar los determinantes antigénicos en una población de células de control y liofilizadas.

45 La patente de Estados Unidos No. 5.045.446 describe la preservación de glóbulos rojos vivos al tiempo que conserva su actividad metabólica. La patente describe el uso de crioprotectores intracelulares tales como galactosa/manosa/xilosa/fructosa/glucosa a una concentración de (12,2-21,7%) junto con PVP extracelular (de peso molecular 10 K-24 K). Las muestras se rehidrataron a 37°C usando una solución de sacarosa al 25,5% en solución salina regulada con fosfato. La recuperación de células intactas fue de 52,9 + 7,9% después de incorporar el polímero con los carbohidratos galactosa, manosa, xilosa, fructosa, glucosa. La trehalosa y la sacarosa en la solución de liofilización mostraron una recuperación celular marginal. Se usó un carbohidrato (sacarosa, trehalosa, manosa, glucosa en orden de preferencia) a una concentración del 3,6% en medio de reconstitución.

50 La patente de Estados Unidos No. 5.648.206 revela la preservación de glóbulos rojos vivos con actividad metabólica retenida. La patente describe el uso de crioprotectores intracelulares tales como galactosa/manosa/xilosa/fructosa/glucosa a una concentración de (12,2 - 21,7%) con PVP como crioprotector extracelular de peso molecular 10 K-24 K. El medio de liofilización contenía monosacárido (xilosa, glucosa, manosa, ribosa, fructosa) a una concentración de 7% - 7,5%. El crioprotector extracelular (PVP/dextrano) que tiene un peso molecular de alrededor de 1 K a 360 K utilizado a una concentración de alrededor del 0,7%. Los datos de trehalosa combinados con PVP no se

divulgan, aunque la patente afirma que cuando la trehalosa y la PVP se usaron juntas en una solución de liofilización, mostraron una recuperación celular marginal.

- 5 La patente de Estados Unidos No. 5.425.951 describe la preservación de glóbulos rojos vivos que retienen su actividad metabólica. La patente describe el método de reconstitución de células liofilizadas que comprende las etapas de tratar células con una solución acuosa que contiene un carbohidrato (glucosa/manosa, trehalosa/sacarosa) a una concentración de al menos 1% y un polímero que tiene un peso molecular de 1 K hasta aproximadamente 360 K (PVP) a una concentración de aproximadamente 20% en peso.
- 10 La solicitud de patente de Estados Unidos No. 2005/0084481 A1 describe la preservación de células de mamífero y de vertebrado, por ejemplo, macrófagos y células madre hematopoyéticas que expresan el receptor P2X7.
- 15 La patente europea EP0444159B1 describe la preservación de células de mamífero, líneas celulares de hibridoma, células de tejido para inmunoensayos y otras mediciones hematológicas. Se usó un fluido isotónico que contenía trehalosa al 10% para conservar los marcadores proteínicos en la superficie de las células de mamíferos. Las etapas implican resuspender las células de mamífero en albúmina regulada con fosfato e incubar el sedimento resultante obtenido después de la centrifugación en solución isotónica de trehalosa al 10% a temperatura ambiente durante aprox. 30 minutos. Esto fue seguido por enfriamiento lento a aproximadamente -70°C durante aprox. una hora.
- 20 Durante el proceso de congelación lenta, el agua extracelular se congelará primero y las sales quedarán fuera, lo que dañará la membrana celular de las células muertas. En el caso de las células vivas (por ejemplo, durante el cultivo celular) se recomienda la congelación lenta (Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Volumen 1768, Número 3, marzo de 2007, páginas 728-736)
- 25 La publicación PCT WO97/04801 (PCT/US96/12251) describe el uso de sacarosa y trehalosa como crioconservantes. La invención abarca el anticuerpo anti-HER2. La formulación previamente liofilizada basada en el regulador de histidina/succinato se desarrolló para mantener el pH de la formulación. Se añadió polisorbato en una formulación previamente liofilizada para reducir la agregación de proteína reconstituida y la formación de partículas.
- 30 La patente también describe el uso de alcoholes aromáticos tales como alcohol bencílico o fenólico en diluyentes reconstituyentes. Se encontró que el regulador lioconservante basado en trehalosa ayuda a la estabilización de la proteína durante 2 semanas a 40°C y el aumento en la concentración de trehalosa aumenta la estabilidad durante 1 año a 30°C. La adición de trehalosa y sacarosa también impidió la agregación en dicha condición de almacenamiento anterior.
- 35 La patente de los Estados Unidos No. 5.759.774 describe un método para detectar tipos de anticuerpos circulantes usando células secas o liofilizadas. La patente describe la conservación de células de mamífero, notablemente glóbulos rojos, linfocitos, plaquetas, liposomas y hemosomas. Los inventores usaron una solución de carbohidrato-polímero como conservante de liofilización en donde el carbohidrato podría ser xilosa, manosa, glucosa, ribosa, manosa o fructosa y el polímero podría ser PVP, HES o dextrano. Las concentraciones de los monosacáridos pentosas y hexosas oscilaron entre 7-37,5%. También modificaron la composición del regulador de liofilización mediante la adición de glutatión inosina, adenina, ácido nicotínico, glutamina,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , dextrosa, PVP y HES y constituyentes del regulador de reconstitución mediante la adición de ATP,  $KH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$  y PVP.
- 40 La patente europea EP 90906036 describe un método de liofilización de células sanguíneas periféricas de mamífero, células cultivadas, líneas celulares de hibridoma o células de tejidos. Las etapas comprendían la incubación del sedimento celular, después de centrifugación, en solución isotónica de trehalosa seguido por el sometimiento de la suspensión celular a congelación a -70°C antes de la liofilización. Las células liofilizadas se reconstituyeron en agua destilada.
- 50 La publicación PCT WO92/14359 (PCT/US92/00782) describe el método de liofilización de células de esperma de mamífero. La patente describe el uso de monosacáridos, preferiblemente glucosa en una concentración de aproximadamente 0,1-2,6 M y polímero (o una mezcla de polímeros) con un peso molecular preferiblemente en el intervalo de 1 K a 350 k. El polímero preferido fue PVP seguido por dextrano, HES y poloxámeros. Se usó PBS como regulador de liofilización con un pH en el intervalo de aproximadamente 7,0 a 7,4. El medio reconstituido sugerido comprendía polímero (Pm 15K) y PBS que contenía glucosa y adenina. Se incorporaron metabolitos celulares típicos tales como ATP y NAD junto con monosacáridos tales como xilosa, glucosa, ribosa, manosa y fructosa (a una concentración de 1 M) además de glucosa.
- 55 La solicitud de patente de Estados Unidos No. 20080057040 describe la crioconservación de células madre. La patente de Estados Unidos No. 5.071.741 describe el uso de agarosa y alginato como no permeantes y glicerol y DMSO (a concentración de 1 M) como permeantes, en la crioconservación de materia celular (línea celular derivada del endotelio aórtico bovino-BFA-Clon 1 e islotes de Langerhans de páncreas murino).
- 60

La patente de Estados Unidos No. 4.004.975 describe el método de aislamiento y crioconservación, a -80°C, glóbulos blancos humanos de sangre completa. La patente sugiere una combinación de crioconservante intracelular (DMSO al 5%) y crioconservante extracelular (HES al 4%).

5 La publicación PCT WO 92/14360 (PCTUS92/00650) describe el método de liofilización y reconstitución de la mezcla de células nucleadas no mamíferas y material sanguíneo. El método fue inventado con el objetivo de desarrollar vacunas contra *Anaplasma Marginale* (toxoplasma). El proceso optimiza el suministro continuo de muestras de sangre infectadas con *Anaplasma spp* (central) ya que los liofilizados de muestra pueden almacenarse durante un período de tiempo prolongado. La mezcla de liofilización está compuesta por monosacáridos (hexosa y pentosa) con al menos dos polímeros anfipáticos biocompatibles. El monosacárido se seleccionó del grupo que consiste en xilosa, glucosa, ribosa, manosa y fructosa. El regulador de reconstitución contenía polímero a una concentración final del 0,7%.

15 La tonicidad de la membrana de la célula viva se mantiene y se necesitan algunos agentes de apertura del poro de la membrana/ATP para abrir los poros para la internalización del crioconservante intracelular para reemplazar el agua de hidratación para preservación o crioconservación (US2005/0084481 A1).

20 Durante la conservación de células vivas también es deseable proporcionar alguna fuente de carbono/ATP (por ejemplo, adenina) para mantenerlas metabólicamente activas (Avances en Biopreservación de John G. Baust), por el contrario, también es deseable mantener un contenido de humedad adecuado para mantenerlas mínimamente metabólicamente activas, de modo que pueden reactivarse más tarde (solicitud de patente de los Estados Unidos No. 20100297231).

25 En el caso de la preservación de células vivas, existen posibilidades de variabilidad de la proteína superficial como consecuencia de la respuesta al microambiente cambiante debido a la adición de crioconservantes. Sin embargo, las células muertas pueden responder mínimamente (o no responder) a las cambiantes condiciones del microambiente, debido a la maquinaria de síntesis de proteínas defectuosa/dañada (Annual Review of Biophysics and Bioengineering, Vol. 3: 341-363).

30 Es deseable preservar la integridad y la inmunogenicidad de las células muertas. La preservación de la morfología y la integridad de las células muertas es útil para diversos fines, incluyendo el desarrollo de terapias asociadas al mecanismo inmune (Infect Immun. Julio de 1978; 21 (1): 348) y diagnósticos (Diagnostic Microbiology and Infectious Disease Volumen 62, No. 2, octubre de 2008, páginas 133-141).

35 La influencia directa del estrés osmótico sobre la membrana celular está documentada para células muertas con observación de vesiculación endocitótica; cambios en la fluidez de la membrana y aumento de la temperatura de transición de fase de la membrana. Esta transición de fase de membrana que se cree que inicia la separación de la fase lipídica y la fusión de la membrana puede afectar directamente la viabilidad de las células muertas deshidratadas. Además, debido a la coexistencia de las diferentes fases durante una transición de fase, la permeabilidad de la membrana aumenta y las células pueden tener contenido celular con fugas durante la rehidratación, lo que reducirá el número de células intactas.

45 El método conocido para la preservación de células vivas no puede extenderse a la preservación de células muertas ya que

1. Las células muertas pierden tonicidad/plasticidad de la membrana y, por lo tanto, pueden colapsar durante la liofilización.

50 2. Las células muertas forman agregados que se pueden atribuir parcialmente a la presencia de ADN extracelular de las células muertas dañadas.

3. La integridad de la membrana de los orgánulos internos de las células muertas está comprometida y, por lo tanto, es realmente desafiante mantener la arquitectura celular interna. (Morphological Features of Cell Death. News in Physiological Sciences, (2004) Vol. 19, No. 3, 124-128.)

55 4. Las células muertas tienen una vesiculación endocitótica diferente; cambios de fluidez de la membrana y temperaturas de transición de fase de la membrana.

60 5. Las células muertas responden mínimamente (o no lo hacen) a las cambiantes condiciones del microambiente, debido a la maquinaria de síntesis de proteínas defectuosa/dañada.

La morfología de una célula como se define en la presente memoria se refiere al tamaño, forma y estructura de la célula.

La presente invención se refiere a un método para conservar células muertas. La invención proporciona un proceso de preparación de una composición de células cancerosas muertas con propiedades inmunogénicas sustancialmente retenidas, que comprende

- 5 a. Muerte de células cancerosas,
- b. tratar la composición obtenida a partir de la etapa a) con crioprotector intracelular trehalosa,
- 10 c. tratar la composición obtenida de la etapa b) con povidona crioprotector extracelular (PVP),
- d. congelar instantáneamente la composición obtenida de la etapa c) con la formulación congelada antes de la liofilización, en la que la congelación rápida se realiza por debajo de  $-100^{\circ}\text{C}$ , y
- 15 e. liofilización de la composición obtenida a partir de la etapa d).

Por lo tanto, el método implica, entre otros, liofilización seguida de reconstitución en la que la morfología, integridad e inmunogenicidad de las células se retienen incluso durante un almacenamiento prolongado. Además, se describen composiciones farmacéuticas que comprenden la inmunogenicidad que retiene las células muertas. Tales composiciones encuentran aplicaciones como vacunas. La composición contiene opcionalmente uno o más adyuvantes para mejorar la inmunogenicidad de las células muertas.

Descripción de dibujos:

25 Figura 1: Determinación del tamaño celular y la granularidad de las células liofilizadas. La dispersión frontal mide el tamaño celular y la dispersión lateral mide la cantidad de granularidad.

Figura 2 A y B: Determinación de la integridad celular usando un colorante PKH26 para tinción liofílica de la membrana celular.

30 Figura 3: Las células liofilizadas no se tiñeron con el colorante PKH26 para determinar la fluorescencia de fondo.

Figura 4: Células con membrana celular intacta y envoltura nuclear

35 Figura 5: Inmunogenicidad de células liofilizadas y luego reconstituidas

Figura 6: Tinción con marcador de superficie bajo microscopio de fluorescencia

Descripción de la invención:

40 La presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de células cancerosas muertas con propiedades inmunogénicas sustancialmente retenidas, que comprende

- a. Muerte de células cancerosas,
- 45 b. tratar la composición obtenida a partir de la etapa a) con crioprotector intracelular trehalosa,
- c. tratar la composición obtenida de la etapa b) con povidona crioprotector extracelular (PVP),
- d. congelar instantáneamente la composición obtenida de la etapa c) con la formulación congelada antes de la liofilización, en la que la congelación rápida se realiza por debajo de  $-100^{\circ}\text{C}$ , y
- 50 e. liofilización de la composición obtenida a partir de la etapa d).

55 Sorprendentemente se ha encontrado que a través de este proceso se puede preparar una composición estable de células muertas con propiedades inmunogénicas retenidas sustancialmente que comprende células muertas, al menos un crioprotector celular, al menos un crioprotector extracelular y excipientes.

60 El crioprotector intracelular es el carbohidrato trehalosa. Sorprendentemente, se ha encontrado que la trehalosa como crioprotector intracelular para maximizar la recuperación de células intactas produce la mayor recuperación celular. El carbohidrato como crioprotector intracelular utilizado tiene una concentración entre el 1 y el 10% p/v.

El crioprotector extracelular es polivinilpirrolidona (PVP).

65 Sorprendentemente, se ha descubierto que el polímero anfipático polivinilpirrolidona (PVP) mejora la recuperación intacta de células como crioprotector extracelular. La PVP utilizada como crioprotector extracelular tiene una

concentración de entre el 0,1 y el 5% p/v. El peso molecular de PVP utilizado está en el intervalo de 30 a 50 kilo Daltons. Para llegar a la presente invención, los inventores llevaron a cabo, por ejemplo, las siguientes etapas

- 5 1. Tratamiento de las células muertas con crioprotectores intracelulares.
2. Tratamiento de las células muertas con crioprotectores extracelulares.
3. Enfriamiento rápido en la formulación congelada antes de la liofilización.
- 10 4. Liofilización de las células muertas tratadas.
5. Reconstitución de los liofilizados (de células muertas).
- 15 6. Evaluación de la preservación de la integridad celular.
7. Evaluación de la efectividad del método de conservación.
8. Evaluación de la conservación de las propiedades antigénicas/inmunogénicas.
- 20 La solución de liofilización se reguló a pH de 7,4 con solución salina regulada con fosfato de Dulbecco (DPBS sin cloruro de calcio y cloruro de magnesio), cuyos componentes fueron fosfato de potasio monobásico (0,20 g/L); cloruro de potasio (0,20 g/L); cloruro de sodio (8,00 g/L) y fosfato de sodio anhidro dibásico (1,15 g/L). El regulador de liofilización contiene una concentración final de aproximadamente 5% en peso por volumen de un disacárido no reductor, preferiblemente trehalosa y una concentración final de aproximadamente 1% en peso por volumen de un polímero, preferiblemente polivinilpirrolidona (peso molecular: 44 K).
- 25 La preservación morfológica, la integridad y la retención de la inmunogenicidad incluso durante almacenamiento prolongado de la composición celular muerta se analizaron de la siguiente manera
- 30 1. Perfiles morfológicos (tamaño): - Citometría de flujo. PKH26 para la integridad de la membrana celular. Tinción con hematoxilina y eosina para la integridad de la membrana citoplasmática y nuclear
2. Perfil fisiológico: - La confirmación de la muerte celular utiliza el colorante yoduro de TOPRO3.
- 35 3. Ensayo de granularidad: - FACS FSC/SSC
4. Análisis citogenético
- 40 5. Perfil de ADN: análisis del contenido de ADN por FACS.
6. Extracción de ADN y electroforesis en gel de agarosa para evaluar la integridad del ADN
7. Inmunofenotipo: - moléculas HLADR
- 45 8. Perfil inmunológico: - CD4<sup>+</sup>, evaluación citotóxica de células CD8<sup>+</sup> y NK con determinantes citotóxicos: Perforina y Granzima.
9. Ensayo funcional: - Ensayo de la función efectora por FACS usando PKH26 y yoduro de TOPRO3 para identificar/confirmar y enumerar las células objetivo muertas. Cuantificación de esplenocitos productores de INFγ y IL-2. Ensayo de proliferación de linfocitos utilizando PKH 26.
- 50

Ejemplo 1: Crioprotector extracelular (ejemplo de referencia)

55 Se trataron 10<sup>7</sup> células/mL de células cancerosas con Mycobacterium w (*Mw*). El porcentaje de muerte celular se determinó empleando el principio de exclusión del colorante azul de tripano. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y se resuspendió el sedimento celular en DPBS. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 1 mL cada una y se contaron las células en cada alícuota. El sedimento del grupo de tratamiento se resuspendió en una solución reguladora de liofilización que contenía un PVP al 1% p/v. Cada alícuota se sometió a enfriamiento rápido en nitrógeno líquido (por debajo de -100°C) seguido de liofilización. El porcentaje de recuperación de células intactas del grupo de tratamiento, estimado después de la reconstitución de liofilizados, fue de 19,125 ± 3,275

Ejemplo 2: Crioprotector intracelular (ejemplo de referencia)

65 Se tomaron 10<sup>7</sup> células/mL de células cancerosas y se trataron con *Mw*. El porcentaje de muerte celular se determinó empleando el principio de exclusión del colorante azul de tripano. Las células se sedimentaron por

centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular del grupo de control se resuspendió en DPBS. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 1 mL cada una y se contaron las células en cada alícuota. El sedimento celular del grupo de tratamiento se resuspendió en una solución reguladora de liofilización que contenía un trehalosa al 5% p/v. Cada alícuota se sometió a enfriamiento rápido en nitrógeno líquido (por debajo de -100°C) seguido de liofilización. El porcentaje de recuperación de células intactas del grupo de tratamiento tras la reconstitución del liofilizado en DPBS, estimado usando un hemocitómetro, fue de  $15,27 \pm 0,64$ .

Ejemplo 3: Polímeros tensoactivos para actividad crioconservante (ejemplo de referencia)

Se tomaron  $10^7$  células/mL de células cancerosas y se trataron con *Mw*. El porcentaje de viabilidad celular se determinó usando el ensayo de exclusión con azul de tripano. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular del grupo de control se resuspendió en DPBS. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 1 mL cada una y se contaron las células en cada alícuota. El sedimento celular del grupo de tratamiento se resuspendió en regulador de liofilización que contenía Polisorbato 80 al 0,05% v/v. Cada alícuota se sometió a enfriamiento rápido en nitrógeno líquido (por debajo de -100°C) seguido de liofilización. El porcentaje de recuperación de células intactas del grupo de tratamiento tras la reconstitución de liofilizado en DPBS, estimado usando un hemocitómetro, fue de aproximadamente 0,9.

Ejemplo 4: tratamiento crioconservante extracelular seguido de tratamiento crioconservante intracelular (ejemplo de referencia)

Se trataron  $10^7$  células/mL de células cancerosas con *Mw*. El porcentaje de muerte celular se determinó empleando el principio de exclusión del colorante azul de tripano. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular del grupo de control se resuspendió en DPBS. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 1 mL cada una y se contaron las células en cada alícuota. El sedimento celular del grupo de tratamiento se resuspendió en PVP a una concentración final de 1% p/v (en DPBS). La suspensión de células se incubó a 37°C durante 15 minutos, posteriormente, se añadió trehalosa hasta una concentración final de 5% p/v (en DPBS) seguido de incubación a 37°C durante 15 minutos. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 1 mL cada una y se contaron las células en cada alícuota. Antes de la liofilización, cada alícuota se sometió a enfriamiento rápido en nitrógeno líquido (por debajo de -100°C). El porcentaje de recuperación de células intactas del grupo de tratamiento tras la reconstitución de liofilizado en DPBS fue de  $28,08 \pm 3,63$

Ejemplo 5: Tratamiento crioconservante intracelular seguido de tratamiento crioconservante extracelular

Se trataron  $10^7$  células/mL de células cancerosas con *Mw*. El porcentaje de viabilidad celular se determinó usando el ensayo de exclusión con azul de tripano. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular de control se resuspendió en DPBS. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 1 mL cada una y se contaron las células en cada alícuota. El sedimento celular del grupo de tratamiento se resuspendió en trehalosa a una concentración final de 5% p/v (en DPBS) seguido de incubación a 37°C por 15 min. Posteriormente, se añadió PVP a una concentración final de 1% p/v y la suspensión celular se incubó a 37°C por 15 min. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 1 mL cada una y se contaron las células en cada alícuota. Antes de la liofilización, todas las alícuotas se sometieron a enfriamiento rápido en nitrógeno líquido (por debajo de -100°C). El porcentaje de recuperación de células intactas del grupo de tratamiento fue de  $55,61 \pm 4,35$ .

Ejemplo 6: Crioconservante intracelular seguido de crioconservante extracelular (ejemplo de referencia)

Se trataron  $10^7$  células/mL de células cancerosas con *Mw*. El porcentaje de muerte celular se determinó empleando el principio de exclusión del colorante azul de tripano. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular del grupo de control se resuspendió en DPBS. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 1 mL cada una y se contaron las células en cada alícuota. El sedimento celular del grupo de tratamiento se resuspendió en dextrosa a una concentración final de 5% p/v (en DPBS) seguido de incubación a 37°C por 15 min. Posteriormente, se añadió HES a una concentración final de 1% p/v y la suspensión celular se incubó a 37°C por 15 min. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 1 mL cada una y se contaron las células en cada alícuota. Antes de la liofilización, todas las alícuotas se sometieron a enfriamiento rápido en nitrógeno líquido (por debajo de -100°C). Después de la liofilización, el porcentaje de recuperación de células intactas en el grupo de tratamiento fue ~54.88, pero la morfología celular se alteró.

Ejemplo 7: Crioconservante intracelular seguido de crioconservante extracelular (ejemplo de referencia)

Se trataron  $10^7$  células/mL de células cancerosas con *Mw*. El porcentaje de viabilidad celular se determinó usando el ensayo de exclusión con azul de tripano. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular del grupo de control se resuspendió en DPBS. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 1 mL cada una y se contaron las células en cada alícuota. El sedimento celular del grupo de tratamiento se resuspendió en glicerol a una concentración final de 5% v/v (en DPBS) seguido de incubación durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadió HES a una concentración final de 1% p/v y la

suspensión celular se incubó a 37°C por 15 min. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 1 mL cada una y se contaron las células en cada alícuota antes de la liofilización. Todas las alícuotas se sometieron a enfriamiento rápido en nitrógeno líquido (por debajo de -100°C). Después de la liofilización, el porcentaje de recuperación de células intactas en el grupo de tratamiento fue ~46,19, aunque se modificó la morfología celular.

5 Ejemplo 8: Crioconservante intracelular seguido de crioconservante extracelular (ejemplo de referencia)

10 Se trataron  $10^7$  células/mL de células cancerosas con *Mw*. El porcentaje de muerte celular se determinó empleando el principio de exclusión del colorante azul de tripano. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular del grupo de control se resuspendió en DPBS. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 1 mL cada una y se contaron las células en cada alícuota. El sedimento celular del grupo de tratamiento se resuspendió en sacarosa a una concentración final de 5% p/v (en DPBS) seguido de incubación durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadió HES a una concentración final de 1% p/v y la suspensión celular se incubó a 37°C por 15 min. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 1 mL cada una y se contaron las células en cada alícuota antes de la liofilización. Todas las alícuotas se sometieron a enfriamiento rápido en nitrógeno líquido (por debajo de -100°C). Después de la liofilización, el porcentaje de recuperación del grupo de tratamiento intacto fue de ~47,25, pero la morfología celular se alteró.

20 Ejemplo 9: Crioconservante extracelular seguido de crioconservante intracelular con aditivos (ejemplo de referencia)

25 Se trataron  $10^7$  células/mL de células cancerosas con *Mw*. El porcentaje de viabilidad celular se determinó usando el ensayo de exclusión con azul de tripano. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular del grupo de control se resuspendió en DPBS. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 1 mL cada una y se contaron las células en cada alícuota. El sedimento celular del grupo de tratamiento se resuspendió en PVP a una concentración final de 1% p/v (en DPBS) seguido de incubación durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadió trehalosa a una concentración final de 5% p/v, seguido de aditivos (ácido nicotínico 0,75 mM, glutamina 0,75 mM,  $MgCl_2$  0,49 mM e histidina 5 mM) a una concentración final de 1%. La suspensión de células se incubó a 37°C por 15 min. Las células en cada alícuota se contaron antes de la liofilización. Todas las alícuotas se sometieron a enfriamiento rápido en nitrógeno líquido (por debajo de -100°C). Después de la liofilización, el porcentaje de recuperación del grupo de tratamiento intacto fue ~11,0

30 Ejemplo 10: Crioconservante intracelular seguido de crioconservante extracelular con aditivos

35 Se trataron  $10^7$  células/mL de células cancerosas con *Mw*. El porcentaje de muerte celular se determinó empleando el principio de exclusión del colorante azul de tripano. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular del grupo de control se resuspendió en DPBS. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 1 mL cada una y se contaron las células en cada alícuota. El sedimento celular del grupo de tratamiento se resuspendió en trehalosa a una concentración final de 5% p/v (en DPBS) seguido de incubación durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadió PVP a una concentración final de 1% p/v, seguido de aditivos (ácido nicotínico 0,75 mM, glutamina 0,75 mM,  $MgCl_2$  0,49 mM e histidina 5 mM) a una concentración final de 1%. La suspensión de células se incubó a 37°C por 15 min. Las células en cada alícuota se contaron antes de la liofilización. Todas las alícuotas se sometieron a enfriamiento rápido en nitrógeno líquido. Después de la liofilización, el porcentaje de recuperación del grupo de tratamiento intacto fue ~48.9

45 Ejemplo 11: Método de congelación (ejemplo de referencia)

50 Se trataron  $1 \times 10^7$  células/mL con *Mw*. El porcentaje de muerte celular, empleando el principio de exclusión con colorante azul de tripano, fue del 60%. Se hicieron 5 alícuotas y las células se sedimentaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos. De los 5 sedimentos celulares obtenidos, cada uno se resuspendió en 100  $\mu$ L de trehalosa 50X seguido de incubación durante 15 minutos a 37°C. Se llevó hasta un volumen final de 1 mL con DPBS. De cada alícuota se distribuyeron 200  $\mu$ L en viales de vidrio marcados apropiadamente y se contaron las células en cada alícuota. Todas las alícuotas fueron sometidas a congelación lenta, es decir, a 8°C durante 1 hora, 4°C durante 2 horas, -20°C durante 4 horas y finalmente a -70°C durante 8 horas. A excepción de un control de congelación, el resto de las alícuotas se sometieron a liofilización durante aproximadamente 48 horas. Se reconstituyeron los liofilizados con 200  $\mu$ L de DPBS y se contó el número total de células intactas usando un hemocitómetro. El control de congelación produjo un 13% de células intactas, mientras que la liofilización dio como resultado una recuperación del 2%.

60 Ejemplo 12: Método de congelación (ejemplo de referencia)

65 Se trataron  $1 \times 10^7$  células/mL con *Mw*. El porcentaje de muerte celular, empleando el principio de exclusión con colorante azul de tripano, fue del 60%. Se hicieron 5 alícuotas y las células se sedimentaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos. De los 5 sedimentos celulares obtenidos, cada uno se resuspendió en 100  $\mu$ L de PVP 10X seguido de incubación durante 15 minutos a 37°C. Se llevó hasta un volumen final de 1 mL con DPBS. De cada alícuota se distribuyeron 200  $\mu$ L en viales de vidrio marcados apropiadamente y se contaron las células en

5 cada alícuota. Todas las alícuotas fueron sometidas a congelación lenta, es decir, a 8°C durante 1 hora, 4°C durante 2 horas, -20°C durante 4 horas y finalmente a -70°C durante 8 horas. A excepción de un control de congelación, el resto de las alícuotas se sometieron a liofilización durante aproximadamente 48 horas. Los liofilizados se reconstituyeron con 200 µL de DPBS y el total de células intactas se contó utilizando un hemocitómetro. El control de congelación produjo 32% de células intactas mientras que la liofilización dio como resultado una recuperación del 5%.

#### Ejemplo 13: Método de congelación (ejemplo de referencia)

10 Se trataron  $1 \times 10^7$  células/mL con *Mw*. El porcentaje de muerte celular, empleando el principio de exclusión con colorante azul de tripano fue del 60%. Se hicieron 5 alícuotas y las células se sedimentaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos. De los 5 sedimentos celulares obtenidos, cada uno se resuspendió en 100 µL de sulfato de dextrano 10X seguido de incubación durante 15 minutos a 37°C. Se llevó hasta un volumen final de 1 mL con DPBS. De cada alícuota se distribuyeron 200 µL en viales de vidrio marcados apropiadamente y se contaron las células en cada alícuota. Todas las alícuotas fueron sometidas a congelación lenta, es decir, a 8°C durante 1 hora, 4°C durante 2 horas, -20°C durante 4 horas y finalmente a -70°C durante 8 horas. A excepción de un control de congelación, el resto de las alícuotas se sometieron a liofilización durante aproximadamente 48 horas. Los sedimentos de células liofilizadas se reconstituyeron en 200 µL de DPBS y el total de células intactas se contó usando un hemocitómetro. El control de congelación produjo 5% de células intactas, mientras que no se observaron células intactas después de la liofilización.

Aunque varios crioprotectores intracelulares y extracelulares fueron capaces de conservar la morfología y la integridad de las células muertas, la trehalosa y la PVP parecen ventajosas sobre otros.

#### 25 Ejemplo 14 (ejemplo de referencia)

1 x 10<sup>7</sup> células B16F1/mL tratadas con *Mw*. El porcentaje de células muertas, empleando el principio de exclusión con colorante azul de tripano, fue del 25%. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 100 µL de trehalosa 50X o 100 µL de PVP 10X y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Se llevó hasta un volumen final de 1 mL con DPBS. Se hicieron cinco alícuotas de 200 µL cada una y se contaron las células en cada alícuota antes de la liofilización. Las muestras se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Excepto un control de congelación, el resto de las muestras se sometieron a liofilización durante aproximadamente 48 horas. Se reconstituyeron los liofilizados con 200 µL de DPBS y el total de células intactas se contó usando un hemocitómetro. El control de congelación produjo 39% de células intactas mientras que la liofilización dio como resultado 9% de recuperación de células intactas. Una combinación de los dos crioprotectores parece ventajosa sobre cualquiera de ellos solo.

#### Ejemplo 15

40 Se trataron células HEK-293, a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/mL, con *Mw*. El porcentaje de muerte celular, empleando el principio de exclusión con colorante azul de tripano fue del 80%. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se descartó. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 5 mL de DPBS y el volumen total se distribuyó en 5 alícuotas de 1 mL cada una. Se contaron las células en cada alícuota seguido de centrifugación a 1.500 rpm durante 10 min. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 100 µL de trehalosa 50X y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron 100 µL de PVP 10X y las muestras se incubaron de nuevo a 37°C durante 30 minutos. Se llevó hasta un volumen final de 1 mL con DPBS. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 200 µL cada una. Todas las alícuotas se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y, excepto un resto de control de congelación, todas se sometieron a liofilización durante aproximadamente 48 h. Se reconstituyeron los liofilizados con 200 µL de DPBS y el total de células intactas se contó usando un hemocitómetro. El control de congelación produjo un 67% de células intactas, mientras que la liofilización dio como resultado una recuperación de células intactas del 49%. Una combinación de los dos crioprotectores parece ventajosa sobre cualquiera de ellos solo.

55 La adición de PVP a la trehalosa conduce a una mayor recuperación de células intactas (~50%) en comparación con cualquiera de ellas solas o la adición de trehalosa a PVP.

#### Ejemplo 16 (ejemplo de referencia)

60 Las células B16F10, a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/mL, se trataron con *Mw*. El porcentaje de muerte celular, determinado mediante el ensayo de exclusión con azul de tripano, fue del 31%. El volumen total se distribuyó en 10 alícuotas de 1 mL cada una y se contó el número de células en cada alícuota antes del procesamiento. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 min. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 100 µL de trehalosa 50 X y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. A continuación, se añadieron 100 µL de HES 10X y las muestras se incubaron de nuevo a 37°C durante 15 minutos. Se llevó hasta un volumen final de 1 mL con DPBS. Se distribuyeron 200 µL en viales de vidrio etiquetados apropiadamente. Las muestras se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y excepto un resto de control de congelación, todas ellas sometidas a liofilización durante aprox.

48 horas. Se reconstituyeron los liofilizados con 200 µl de DPBS y el total de células intactas se contó usando un hemocitómetro. El control de congelación produjo un 95% de células intactas, mientras que la liofilización dio como resultado una recuperación de células intactas del 70%, pero una cantidad significativa de células se agrupó.

- 5 La trehalosa + PVP parece ser la mejor entre todas las otras combinaciones probadas de diferentes crioprotectores.

Ejemplo 17: Evaluación del tamaño y la granularidad celular

- 10 La citometría de flujo puede proporcionar información sobre el tamaño celular y la granularidad de la suspensión de tejido homogéneo o heterogéneo/suspensión celular en el medio. El tamaño celular se mide como la luz láser difractada generada a partir de la membrana celular; y la granularidad es la medida de la luz reflejada y refractada que se emite al dirigirse a los gránulos de una célula. El tamaño celular se mide en la escala de dispersión frontal (FSC) de la gráfica de puntos; y granularidad en la escala de dispersión lateral (SSC) de la gráfica de puntos.
- 15 La evaluación de las células liofilizadas indica dos poblaciones distintas, como se muestra en la Figura 1. La población P1 aparece en una población FSC y SSC menor que la población P2, lo que sugiere que la población P2 es más grande y posee más gránulos en comparación con la población P1.

Ejemplo 18: Determinación de la integridad celular

- 20 Las células liofilizadas se tiñeron con la molécula de unión a lípidos de la membrana celular PKH26. PKH26 es excitada por el láser azul y absorbe luz a 551 nm y emite luz a 567 nm. La Figura 2 muestra que tanto la población P1 como P2 absorben el colorante PKH26. Las células liofilizadas se tiñeron con el colorante PKH26. El 90,7% de la población P1 y el 96,3% de la población P2 son PKH26+ve.

Ejemplo 19: Determinación de la muerte celular.

- 25 La muerte celular se evaluó mediante el colorante de yoduro de propidio (PI), que penetra en las células con la membrana celular comprometida. La Figura 3 muestra que tanto P1 como P2 absorben el colorante PI, lo que sugiere que ambas poblaciones están muertas. Células liofilizadas se tiñeron con el colorante PI. El 78,3% de la población P1 y el 97,8% de la población P2 son PI+ve.

Ejemplo 20: Células con membrana celular intacta y envoltura nuclear

- 35 La formulación se tiñó con hematoxilina y eosina para evaluar la integridad de la membrana citoplasmática y nuclear. Se observaron células intactas con núcleo intacto (Figura 4).

Ejemplo 21:

- 40 Las células *MiaPaCa 2*, a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/mL, se trataron con *Mw*. El porcentaje de muerte celular, determinado mediante el ensayo de exclusión con azul de tripano, fue del 100%. El volumen total se distribuyó en 2 alícuotas de 5 mL cada una y se contó el número de células en cada alícuota antes del procesamiento. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 min. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 100 µL de trehalosa 50 X y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente,
- 45 se añadieron 100 µL de PVP 10X y se incubaron nuevamente partes alícuotas a 37°C durante 15 minutos. Se distribuyeron 200 µL en viales de vidrio etiquetados apropiadamente y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Un juego de viales se liofilizó durante aprox. 48 horas. Se reconstituyeron los liofilizados con 200 µL de DPBS y la suspensión celular se inyectó en ratones Balb/c los días 1 y 21. Se administraron células formuladas no liofilizadas en el grupo control los días 1 y 21. El día 28, todos los ratones se sacrificaron y los esplenocitos fueron
- 50 aislados. Se realizó ELISPOT de interferón gamma para evaluar la respuesta inmune. Las células liofilizadas mostraron la misma cantidad de células que producen interferón gamma que indica inmunogenicidad retenida, de hecho un poco mejor. (Figura 5).

Ejemplo 22:

- 55 Se sedimentaron  $10^7$  células muertas/mL de células cancerosas por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 1 mL cada una y se contaron las células en cada alícuota. El sedimento celular del grupo de tratamiento se resuspendió en trehalosa a una concentración final de 5% p/v (en DPBS) seguido de incubación a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente, se
- 60 añadió PVP a una concentración final de 1% p/v y la suspensión celular se incubó a 37°C durante 15 minutos. El volumen total se distribuyó en alícuotas de 1 mL cada una y se contaron las células en cada alícuota. Antes de la liofilización, todas las alícuotas se sometieron a congelación instantánea en nitrógeno líquido. Las células se reconstituyeron en DPBS.

65

Se preparó un frotis en un portaobjetos de vidrio; se secó al aire y se fijó con acetona. Se bloqueó durante 1 hora con regulador de bloqueo que contenía 5% de BSA, suero y 2% de Triton-X 100 en PBS. Se usó incubación durante 1 hora con anticuerpo primario dirigido contra un marcador de superficie celular para detección a diluciones 1:100.

- 5 Se lavó con PBS que contenía tritón. Se incubó con Ab secundario marcado con IgG-FITC antirratón (1:1000). Se lavó con PBS que contenía tritón.

10 Las proteínas de la superficie se detectan bajo microscopio fluorescente como se muestra en la Figura 6. El método se puede utilizar para el transporte de muestras de tejido muerto o vivo y luego utilizarlas para diagnóstico o análisis forense.

15 Tanto los crioprotectores intracelulares como extracelulares son capaces de conservar la morfología de las células tratadas con *Mw*. La PVP y la trehalosa parecen ventajosas tanto con respecto al dextrano como al Polisorbato 80 en el que las células parecían estar agrupadas.

Una combinación de los dos crioprotectores parece ventajosa sobre cualquiera de ellos solo. La adición de PVP a la trehalosa conduce a una mayor recuperación de las células intactas (aproximadamente 50%) en comparación con cualquiera de ellas sola o la adición de trehalosa a la PVP.

- 20 El método de conservación por liofilización se puede usar para conservar candidatos de vacunas de células completas con inmunogenicidad retenida, estructura intacta y ácido nucleico. El método también se puede utilizar para conservar muestras de células para aplicaciones forenses y propósitos de diagnóstico.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para preparar una composición de células cancerosas muertas con propiedades inmunogénicas sustancialmente retenidas, que comprende
- a. Muerte de células cancerosas,
- 10 b. tratar la composición obtenida a partir de la etapa a) con crioprotector intracelular trehalosa,
- c. tratar la composición obtenida de la etapa b) con povidona crioprotector extracelular (PVP),
- 15 d. congelar instantáneamente la composición obtenida de la etapa c) con la formulación congelada antes de la liofilización, en la que la congelación rápida se realiza por debajo de -100°C, y
- e. liofilización de la composición obtenida a partir de la etapa d).
2. El procedimiento de preparación de la composición según la reivindicación 1, en el que la liofilización se lleva a cabo a un vacío inferior a 25 mTorr.
- 20 3. El procedimiento de preparación de la composición según la reivindicación 1, en el que la liofilización se lleva a cabo por debajo de 25°C.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la trehalosa varía en una concentración de 1 a 10% p/v.
- 25 5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la PVP varía en una concentración de 0,1 a 5% en p/v.
- 30 6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la PVP tiene un peso molecular que varía de 30 a 50 kilo Daltons.

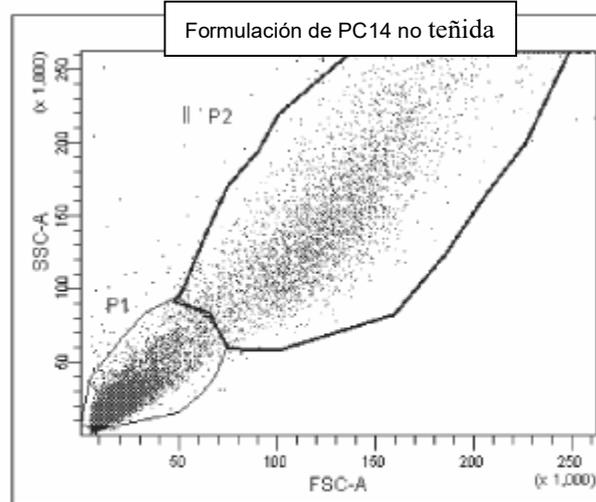


Figura 1

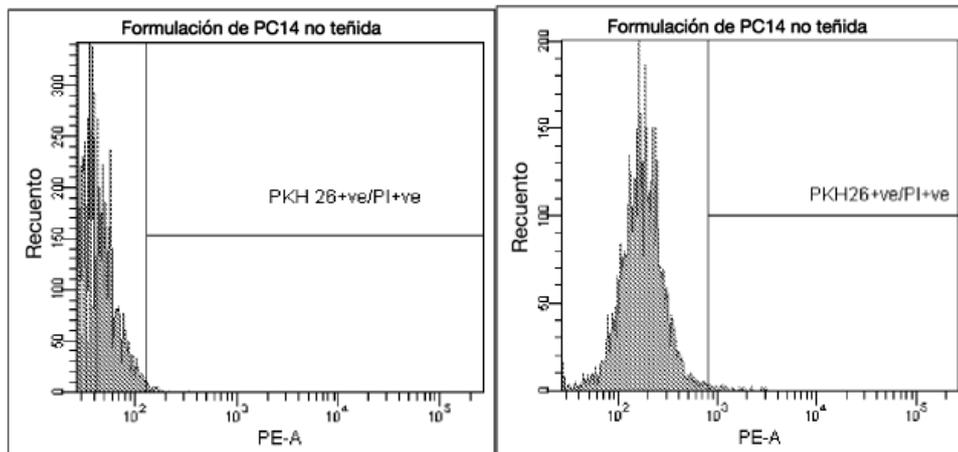


Figura 2A

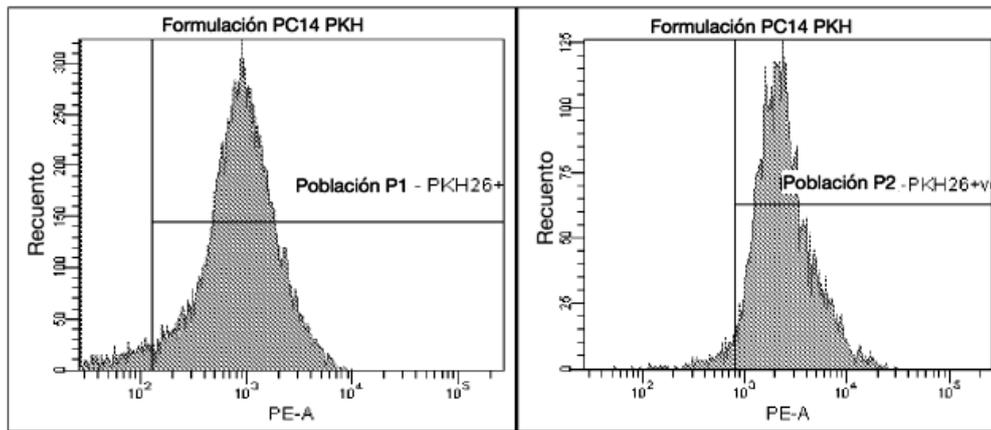


Figura 2B

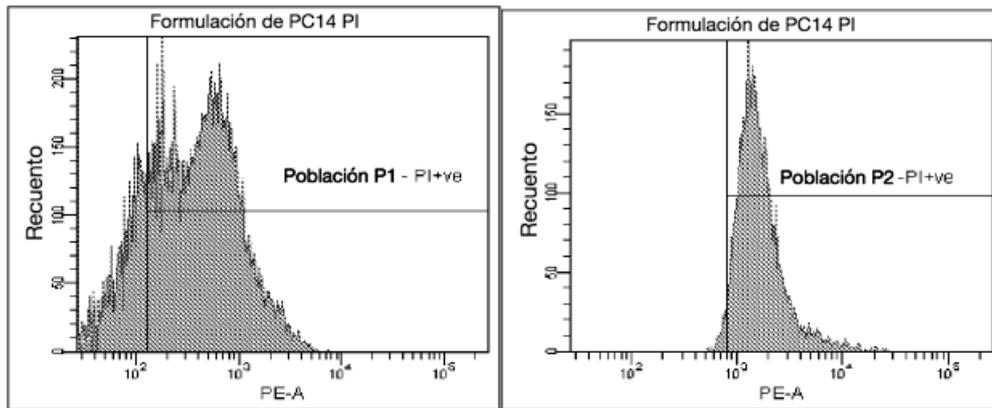


Figura 3

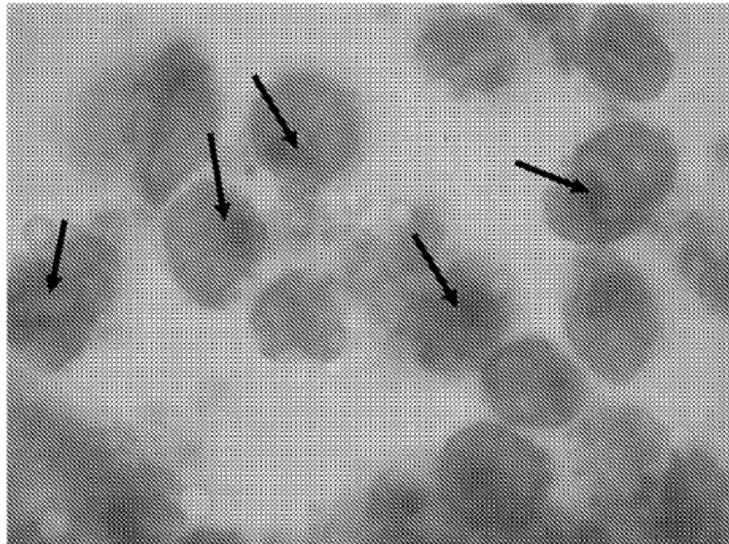


Figura 4

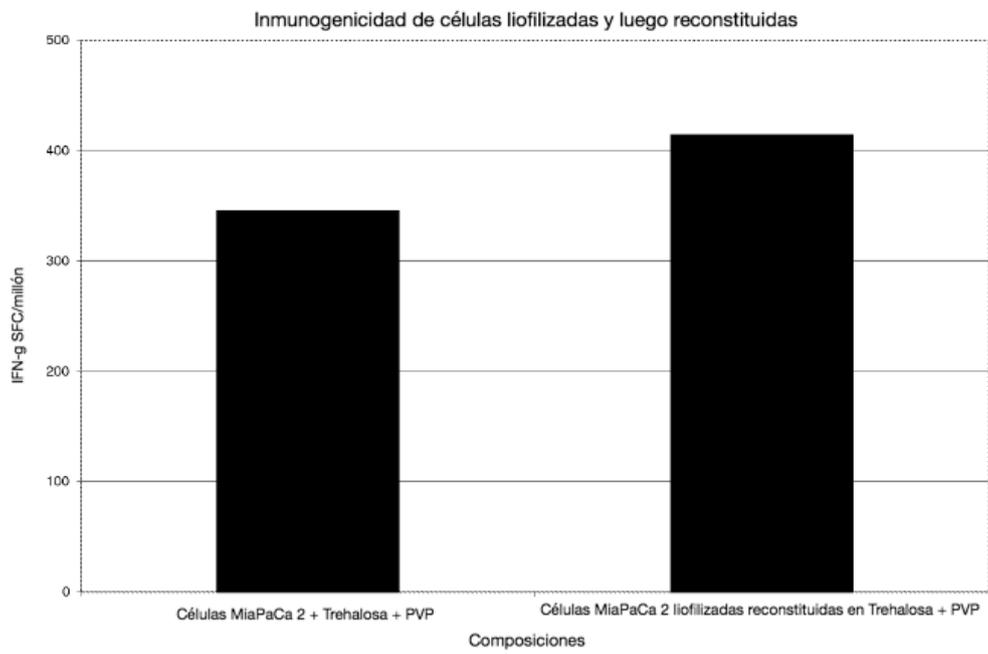


Figura 5

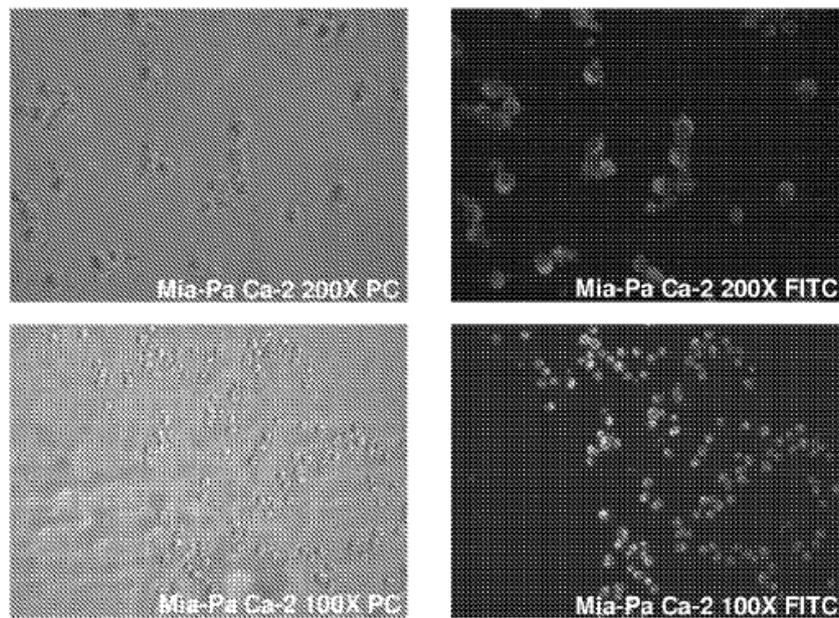


Figura 6