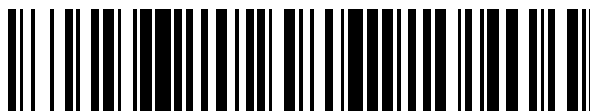


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 048**

51 Int. Cl.:

C12N 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2003 E 11180306 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2395073**

54 Título: **Procedimiento de secado**

30 Prioridad:

01.11.2002 GB 0225520
01.11.2002 GB 0225532
01.11.2002 GB 0225543
24.07.2003 GB 0317381
24.07.2003 GB 0317380
24.07.2003 GB 0317371

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.01.2018

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

MAYERESSE, YVES

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 649 048 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

Procedimiento de secado

La presente invención se refiere a la conservación de muestras biológicas y otras muestras lábiles, a tales muestras conservadas y a un procedimiento novedoso para conservar tales muestras. El procedimiento novedoso comprende
 5 añadir una muestra que incluye un principio activo y un agente estabilizante a un recipiente, sometiendo la muestra a unas condiciones de temperatura y presión tales que provoquen la pérdida de disolvente por evaporación sin que la muestra se congele o burbujee para formar una espuma. Posteriormente, durante una fase de secado secundaria, las condiciones de presión y temperatura se mantienen o se ajustan de tal manera que se elimina el disolvente y la muestra de conservación se seca para formar un líquido altamente viscoso. Adicionalmente por la presente
 10 invención se proporcionan composiciones conservadas por el procedimiento de la presente invención y en particular composiciones de vacunas conservadas.

Se necesita aumentar la estabilidad y de esta forma la vida útil de muestra lábiles, particularmente de muestras biológicas. Tradicionalmente, esto se ha llevado a cabo usando el procedimiento de secado por congelación en el que se elabora una solución de la sustancia y la muestra se congela. Durante la fase de secado primaria, la mayor
 15 parte del agua se elimina por sublimación a partir de hielo bajo condiciones de presión reducida y se forma una 'torta' porosa. A esto le sigue generalmente una fase de secado secundaria cuando la presión y temperatura cambian y el agua se evapora de la 'torta' sólida. La muestra liofilizada resultante ha mejorado la estabilidad comparada con la formulación líquida. Sin embargo, el procedimiento de secado por congelación es de larga duración, caro y puede ser la etapa limitante de velocidad en un procedimiento de producción.

El secado por congelación puede conducir también a la pérdida de actividad o antigenicidad de algunos principios activos. Para ciertos materiales biológicos como por ejemplo virus vivos, puede haber una pérdida significativa de actividad durante el procedimiento de secado por congelación (Pikal (1994) ACS Symposium 567:120-133). Muchas sustancias secadas por congelación son todavía inestables a temperatura ambiente (Carpenter y col (1994) ACS Symposium 567:134-147).

El daño provocado por el procedimiento de congelación se puede evitar en alguna medida por el uso de agentes estabilizantes como polioles. También se han realizado mejoras adicionales en el procedimiento de liofilización evitando la congelación de la muestra durante el procedimiento y retirando agua por ebullición (documento WO96/40077; US6306345). Este procedimiento implica preparar una mezcla de un material que forma matrices de vidrio en un disolvente adecuado junto con la muestra que se va a conservar, evaporar la mayor parte del disolvente
 30 de la mezcla para obtener un jarabe, exponer el jarabe a una presión y temperatura suficientes para provocar la ebullición del jarabe y la retirada del disolvente residual. Se puede hacer referencia a procedimientos similares a este como técnicas de secado por espuma. Tales técnicas expondrán la muestra que va a ser conservada a tensiones debido a la formación y estallamiento de burbujas durante la etapa de 'ebullición'. Especialmente cuando se van a conservar sustancias lábiles, esto puede dar lugar a una pérdida de actividad.

Un procedimiento similar se describió en el documento US5.766.520, en el que el procedimiento requiere retirar parcialmente el agua para formar un fluido viscoso y someter además el jarabe a vacío para provocar que 'ebulla' y secar además a temperaturas sustancialmente inferiores a 100 °C. Este procedimiento todavía sufre algunos de los problemas de secado por congelación convencional. Cuando el procedimiento se lleva a cabo en un secador por congelación de gran tamaño, las muestras se secarán a diferentes velocidades dependiendo de su posición en la
 40 bandeja y esto lleva a que diferentes muestras pierdan una cantidad diferente de actividad durante el procedimiento de secado. Esto lleva a una falta de consistencia dentro de un lote.

La trehalosa es un poliol que se favorece para sus propiedades estabilizantes. La trehalosa es un disacárido de origen natural, inerte, no reductor y no tóxico, que forma vidrio que se encontró inicialmente que estaba asociado a la prevención de daño por desecación en algunas plantas y animales. La trehalosa es útil en prevenir la
 45 desnaturalización de una amplia diversidad de sustancias incluyendo proteínas, virus y materiales alimenticios durante la desecación y posterior almacenamiento, en parte porque tiene una temperatura de transición de vidrio relativamente alta (aproximadamente 120 °C en el estado anhidro) (documentos US4891319; US5149653; US5026566). La trehalosa también estabiliza enzimas (Argall y Smith (1993) Biochem. Mol. Biol. Int. 30; 491). Se ha encontrado también que la trehalosa y una amplia variedad de polioles estabilizantes son útiles en la mejora de la conservación de muestras secadas por congelación, especialmente en casos donde la muestra es propensa a perder actividad durante el procedimiento de secado por congelación. Otros azúcares útiles en técnicas de liofilización incluyen sacarosa y lactosa.

Worral y col. (Vaccine, Vol. 19, N.º 7-8, 2000, pp. 834-839) desvela un procedimiento que implica etapas de secado primario y secundario. Sin embargo, la etapa de secado primario está acompañada de burbujeo drástico.

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado de conservación de un principio activo, particularmente si el principio activo es lábil y propenso a perder actividad durante un procedimiento de secado más convencional. El procedimiento comprende las etapas de preparar una muestra de conservación disolviendo/suspendiendo un principio activo en una solución y un agente estabilizante; someter la muestra de

conservación a unas condiciones de presión y temperatura tales que la muestra de conservación pierda disolvente por evaporación sin que la muestra se congele o burbujee para formar espuma; y retirar el disolvente hasta que la muestra de conservación se seque para formar un líquido altamente viscoso.

5 El procedimiento es muy suave y no expone el principio activo a congelación o ebullición, y por lo tanto es ventajoso respecto a técnicas de secado por congelación y de secado por espuma convencionales las cuales someterían la muestra a una o ambas de estas tensiones. Cuando el principio activo que se va a conservar es lábil, el uso del procedimiento de la invención da lugar a una retención aumentada de actividad y/o antigenicidad. Esto se puede medir reconstituyendo el principio activo secado en disolvente, preferentemente agua o una solución acuosa, y midiendo la actividad o antigenicidad mediante un ensayo convencional (por ejemplo mediante ELISA) y comparando los resultados con aquello obtenido con una muestra no secada o con muestras secadas por técnicas de secado por congelación o secado por espuma, y luego reconstituidas.

15 Es particularmente ventajoso secar VPI (virus de la polio inactivado, el inmunógeno en vacuna de la polio inyectable) usando el procedimiento de la invención. El VPI está presente en vacunas conocidas en forma de una formulación líquida (documento WO99/48525). Han surgido problemas al intentar usar una formulación sólida de VPI en una vacuna ya que los procedimientos de secado por congelación convencionales dan lugar a una pérdida de antigenicidad de VPI. El procedimiento de la invención da lugar a una retención mucho más alta de los antígenos del virus de la polio, debido parcialmente al tiempo reducido requerido para el procedimiento de la invención.

20 El procedimiento de la invención es ventajoso respecto al secado por congelación normal ya que el ciclo de puesta en marcha es más corto y requiere menos refrigeración haciéndolo más eficaz en cuanto a la energía. Como el procedimiento de secado es a menudo la etapa limitante de velocidad de un procedimiento, el uso del procedimiento de la invención da lugar a niveles de producción más altos a coste reducido.

Descripción de las figuras

Figura 1 - Fotografía del líquido de alta viscosidad en viales invertidos.

Descripción detallada

25 El procedimiento de la invención se usa para conservar un principio activo y comprende las etapas de:

a) preparar una muestra para conservación disolviendo/suspendiendo un principio activo en una solución de un agente estabilizante;

30 b) someter la muestra para conservación a una condición de temperatura entre 5 °C y 37 °C y una condición de presión por debajo de 2 kPa tal que la muestra para conservación pierda disolvente por evaporación, sin implicar congelarse o burbujear en la formación espuma, para formar un líquido viscoso, en el que un líquido viscoso es el producto de la fase primaria de la retirada de disolvente;

35 c) someter además la muestra para conservación a una condición de temperatura entre 5 °C y 37 °C y tales condiciones de presión de tal manera que el líquido viscoso se seca para formar un líquido altamente viscoso en el que la presión se reduce en la etapa c) en comparación con la presión durante la etapa b), en la que el agente estabilizante comprende un poliol formador de vidrio, seleccionado del grupo que consiste en glucosa, maltulosa, iso-maltulosa, lactulosa, sacarosa, maltosa, lactosa, sorbitol, isomaltosa, maltitol, lactitol, palatinit, trehalosa, raffinosa, estaquiosa, melezitosa y dextrano, en la que la concentración del agente estabilizante usado está entre el 5 % y el 50 % peso/volumen, en la que el líquido altamente viscoso tiene un contenido de disolvente menos de o igual al 15 % (p/p) y en el que el agente activo comprende una vacuna que comprende un virus.

40 El procedimiento para conservar un principio activo produce una forma del principio activo que es capaz de aguantar un almacenamiento prolongado durante el que se mantiene la actividad y/o antigenicidad y/o inmunogenicidad del principio activo. Preferentemente el principio activo retiene al menos un 40, 50, 60, 70, preferentemente un 80, 90, 95 % de su actividad, antigenicidad y/o inmunogenicidad originales durante un período de almacenamiento de al menos 3, 6, 9, 12, 24 meses a 4 °C. La antigenicidad o inmunogenicidad pueden medirse por ensayos convencionales como se describe posteriormente.

45 El procedimiento es particularmente útil para alargar la vida útil de productos lábiles que pierden actividad rápidamente cuando se almacenan en forma de solución o cuando se exponen a congelación o burbujeo para formar espuma.

50 Un producto lábil es propenso a una pérdida de actividad y/o a una pérdida de antigenicidad y/o inmunogenicidad, después del almacenamiento en forma de solución y/o congelación y/o sometimiento a tensiones tales como por ejemplo aquellas involucradas en el burbujeo durante la formación de espuma.

Es particularmente aplicable para su uso cuando es ventajosa una concentración más baja (por ejemplo del 3 %-15 % p/v) del poliol que forma vidrio y se prefiere un procedimiento de secado más corto (menos de 4, 6, 8, 10 o 12 horas).

Se define un líquido viscoso como el producto de la fase primaria de la retirada de disolvente, al final del cual la mayor parte del disolvente se ha perdido de la muestra. Este punto se puede reconocer porque la velocidad de evaporación disminuye de tal forma que la temperatura de la muestra vuelve a la temperatura ambiente ya que el efecto endotérmico de la mayor parte de la evaporación se pierde.

- 5 Se produce un líquido altamente viscoso después de que el líquido viscoso producido al final de la fase primaria de secado se haya expuesto a presión reducida durante un período adicional de tiempo después del final de la fase primaria de secado. Un líquido altamente viscoso tiene un contenido de disolvente de menos de o igual a un 15, 12, 10, 8, 5, 4, 3, 2 o un 1 % (p/p), preferentemente como se determina por el analizador de humedad coulombiográfico de Karl Fischer (Eur. J. Pharm. Biopharm. (2000) 50; 277-284). Los intervalos preferidos de contenido en disolvente son 1-3 %, 3-5 %, 5-10 % o 10-15 % (p/p). El líquido altamente viscoso tiene un contenido en disolvente suficientemente bajo, de tal forma que el principio activo se conserva en un estado estable durante al menos 3, 6, 9, 12 o 24 meses a 4 °C, permitiendo al principio activo retener al menos un 40, 50, 60, preferentemente un 70, 80, 90, 95 % de su actividad y/o antigenicidad y/o inmunogenicidad durante este período. Preferentemente, el líquido altamente viscoso tiene una apariencia sólida pero es una goma o vidrio, preferentemente un vidrio, y es capaz de fluir muy lentamente durante un período de 2, 4 o 6 días, preferentemente 1, 2, 3 o 4 semanas, más preferentemente 2, 4, 6, 8, 10 o 12 meses. Puede medirse el flujo extremadamente lento invirtiendo un receptáculo que contiene el líquido altamente viscoso y dejándolo a temperatura ambiente hasta que el líquido altamente viscoso se observa que fluye. En una realización preferida, el líquido altamente viscoso no parecerá fluir después de 2, 4 o 6 días, preferentemente 1, 2, 3 o 4 semanas, más preferentemente 2, 4, 6, 8, 10 o 12 meses en una posición invertida.

20 Preparación de la muestra para conservación

Los agentes estabilizantes adecuados para su uso en la primera etapa de la presente invención permiten al principio activo almacenarse sin pérdida sustancial de actividad por desnaturalización, agregación u otros medios. Los materiales adecuados comprenden un poliol que forma vidrio seleccionado del grupo que consiste en glucosa, maltulosa, iso-maltulosa, lactulosa, sacarosa, maltosa, lactosa, iso-maltosa, maltitol, lactitol, palatinit, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melezitosa o dextrano, más preferentemente trehalosa, sacarosa, sorbitol, rafinosa, manitol, lactosa, lactitol o palatinit, más preferentemente sacarosa, sorbitol, lactosa o trehalosa.

Los polisacáridos bacterianos se describen para su uso como un agente estabilizante en una composición inmunogénica ya que pueden actuar como un agente estabilizante y como un inmunógeno.

- 30 Los carbohidratos incluyen, pero no se limitan a, monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y sus correspondientes alcoholes de azúcares, compuestos polihidroxílicos como por ejemplo derivados de carbohidratos e carbohidratos químicamente modificados, almidón hidroxietílico y copolímeros de azúcares. Tanto los carbohidratos naturales como los sintéticos son adecuados para su uso. Los carbohidratos sintéticos incluyen, pero no se limitan a, aquellos los cuales tienen el enlace glucosídico reemplazado por un enlace tiol o de carbono. Se pueden usar las formas D y L de los carbohidratos. El carbohidrato puede ser no reductor o reductor. Cuando se usa un carbohidrato reductor, se prefiere la adición de inhibidores de la reacción de Maillard.

35 Los carbohidratos reductores adecuados para su uso en la invención son aquellos que se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, glucosa, maltosa, lactosa, fructosa, galactosa, manosa, maltulosa y lactulosa. Los carbohidratos no reductores incluyen pero no se limitan a, glucósidos no reductores de compuestos polihidroxílicos seleccionados de alcoholes de azúcares y otros polialcoholes de cadena lineal. Otros carbohidratos útiles incluyen rafinosa, estaquiosa, melezitosa, dextrano, sacarosa, celobiosa, manobiosa y alcoholes de azúcares. Los glucósidos de alcoholes de azúcares son preferentemente monoglucósidos, en particular los compuestos que se obtienen por reducción de disacáridos como por ejemplo lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa.

Son carbohidratos particularmente preferidos la trehalosa, sacarosa, sorbitol, maltitol, lactitol, palatinit y glucopiranosil-1→6-manitol.

- 45 Los aminoácidos pueden actuar como agentes estabilizantes en combinación con el poliol que forma vidrio. Los aminoácidos preferidos incluyen glicina, alanina, arginina, lisina y glutamina, aunque cualquier aminoácido, o una combinación de aminoácidos, péptido, proteína hidrolizada o proteína como por ejemplo la albúmina del suero, puede actuar como un agente estabilizante.

50 La concentración del agente estabilizante que se usa en el procedimiento de la invención puede estar entre un 1 % y un 50 % p/v, preferentemente 5-10 %, 15-20 %, 20-25 % o 25-50 %, más preferentemente menos de o igual a un 15 % o un 10 % (p/v). Las cantidades de agente estabilizante requerido son proporcionales a las cantidades de sales presentes. Por lo tanto, aunque se prefieren niveles de agente estabilizante entre un 5 % y un 10 %, se pueden requerir concentraciones más altas de un 10 % a un 25 % a muestras secas con un contenido en sales alto (por encima de 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM o 500 mM).

- 55 Preferentemente, la muestra para conservación contendrá un componente capaz de inhibir la formación de cristales en el líquido altamente viscoso de la invención. Las sales y otras moléculas incluyendo aminoácidos y rojo de fenol inhiben la formación de cristales.

Recipiente

- Pueden procesarse simultáneamente diferentes mezclas y diversas formas y tamaños de recipientes. Idealmente, el tamaño del recipiente que se usa es suficiente para contener la mezcla inicial y acomodar el volumen del sólido formado de la misma. Típicamente, éste se determina mediante la masa del material que forma vidrio, el área de la superficie del recipiente y las condiciones de la formación de vidrio. La masa del material que forma vidrio debe ser suficiente para dar un jarabe viscoso lo que prácticamente se traduce como una mínima masa por unidad de área de la superficie del recipiente. Esta relación varía de mezcla a mezcla y al recipiente usado pero se determina fácilmente de forma empírica mediante un experto en la materia siguiendo los procedimientos establecidos en el presente documento. Puede usarse cualquier vial, incluyendo viales moldeados de tipo Wheaton y cortados en tubo.
- 5 El procedimiento de la invención usa preferentemente recipientes con un repelente de disolventes, preferentemente una superficie interior repelente de agua. Esto se logra revistiendo la superficie interior con una composición hidrófoba, por ejemplo por recubrimiento con silicona. El recubrimiento con silicona se logra por procedimientos que los expertos en la materia conocen bien. En un procedimiento, el recipiente se recubre con silicona haciendo subir una emulsión de silicona por el interior del recipiente, seguido del procesamiento a través de un horno a elevada temperatura, típicamente 350 °C. Alternativamente, la superficie interior repelente de agua se obtiene haciendo el recipiente de una composición repelente de agua.
- 10
- 15

La superficie interior repelente de agua del recipiente hace que el producto secado del procedimiento sea más fácil de reconstituir ya que la menor parte del agua se recoge en los lados del recipiente.

- Aunque pueden usarse formas singulares en el presente documento, puede estar presente más de un material formador de matrices de vidrio, más de un aditivo y más de una sustancia. Un experto en la materia determina fácilmente las cantidades eficaces de estos componentes.
- 20

Solución

- El disolvente en el que se mezclan el agente estabilizante y el principio activo puede ser acuoso, orgánico o una mezcla de ambos. Puede usarse suficiente disolvente acuoso para disolver el material formador de matrices de vidrio y suficiente disolvente orgánico para disolver una sustancia hidrófoba, permitiendo la formación de sustancia o sustancias hidrófobas que incorporan vidrio.
- 25

- La elección del disolvente dependerá de la naturaleza del material elegido para la formación de la matriz de vidrio, así como de la naturaleza de cualquier aditivo y/o sustancia que se vaya a incorporar. El disolvente debería ser de una naturaleza y de un volumen suficiente para dar lugar a una adecuada solubilización del material formador de matrices de vidrio así como cualquier aditivo y/o sustancia. Si la sustancia es un material hidrófilo, el líquido será preferentemente acuoso para evitar cualquier pérdida potencial de actividad debido a interacciones indeseables del disolvente. Preferentemente, el disolvente acuoso incluye cualquier disolvente acuoso adecuado conocido en la técnica, incluyendo, pero que no se limita a, agua y soluciones tamponadoras biológicas. Preferentemente, el disolvente acuoso está presente en una cantidad de un 5 a un 98 % en volumen, más preferentemente un 80-98 % en volumen, lo más preferentemente un 85-98 % en volumen.
- 30
- 35

- El volumen de disolvente puede variar y dependerá del material formador de matrices de vidrio y de la sustancia que se va a incorporar así como de cualquier aditivo. El volumen mínimo requerido es una cantidad necesaria para solubilizar los diversos componentes. Sin embargo, también pueden usarse suspensiones de la sustancia o sustancias homogéneamente dispersadas. Las cantidades adecuadas de los componentes en realizaciones específicas son fácilmente determinables por los expertos en la materia a la luz de los ejemplos que se proporcionan en el presente documento.
- 40

- Pueden introducirse diversos aditivos en la muestra para conservación. Un aditivo preferido es un inhibidor de la reacción de Maillard. Preferentemente, si la sustancia y/o el material formador de matrices de vidrio contiene grupos carbonilo y amino, imino o guanidinio, las composiciones las composiciones contienen además al menos un inhibidor de la reacción de Maillard fisiológicamente aceptable en una cantidad efectiva para prevenir sustancialmente la condensación de grupos amino y grupos carbonilo reactivos en la composición. El inhibidor de la reacción de Maillard puede ser cualquiera conocido en la técnica. El inhibidor está presente en una cantidad suficiente para prevenir, o prevenir sustancialmente, la condensación de grupos amino y grupos carbonilo reactivos. Típicamente, los grupos amino están presentes en la sustancia y los grupos carbonilo están presentes en el material formador de matrices de vidrio, o a la inversa. Sin embargo, los grupos aminoácido y carbonilo pueden ser intramoleculares dentro de la sustancia o del carbohidrato.
- 45
- 50

- Se sabe que varias clases de compuestos muestran un efecto inhibitorio en la reacción de Maillard y por lo tanto, se usan en las composiciones descritas en el presente documento. Estos compuestos son generalmente inhibidores competitivos o no competitivos de la reacción de Maillard. Los inhibidores competitivos incluyen, pero no se limitan a, residuos de aminoácidos (tanto D como L), combinaciones de restos de aminoácidos y péptidos. Son particularmente preferidos la lisina, arginina, histidina y el triptófano. La lisina y la arginina son los más eficaces. Hay muchos inhibidores no competitivos conocidos. Estos incluyen, pero no se limitan a, aminoguanidina y derivados y amfotericina B. El documento EP-A-0 433 679 describe también inhibidores de Maillard adecuados, los cuales
- 55

incluyen derivados de 4-hidroxi-5,8-dioxoquinolina.

5 Resulta ventajoso incorporar un tinte coloreado en la muestra de conservación para permitir una visualización más fácil del producto secado del procedimiento de la invención. Esto es particularmente importante durante la reconstitución para asegurar que el líquido altamente viscoso se reconstituye en su totalidad previo al uso. Preferentemente, el tinte coloreado mantiene su color a un pH neutral y es compatible con la inyección al paciente. Más preferentemente el tinte coloreado es el rojo de fenol.

Pérdida de disolvente por evaporación (secado por evaporación - etapa b)

10 El procedimiento de la invención implica someter la muestra para conservación a unas condiciones de presión y temperatura tales que la muestra para conservación pierda disolvente por evaporación, sin que la muestra se congele o burbujee para formar espuma.

La temperatura dentro de la muestra para conservación será, a veces, diferente de la externa de la muestra debido a la naturaleza endotérmica del procedimiento de evaporación.

15 Las referencias a la temperatura son a las condiciones externas a la muestra para conservación, por ejemplo, cuando se usa un secador por congelación industrial, a la temperatura de la bandeja. Esto corresponde generalmente a la temperatura fijada del secador por congelación.

Opcionalmente está presente en el procedimiento de la invención una etapa preliminar de desgasificación de la muestra para conservación. La presión se reduce hasta o por debajo de 20 kPa, preferentemente entre 20 y 3,5 kPa, durante un período de al menos 5 minutos antes de que la presión se reduzca aún más.

20 Una realización preferida de la invención logra el secado evaporativo reduciendo la presión mientras se controlan las condiciones de temperatura. La presión se ajusta hasta o por debajo de 2, preferentemente 1,5, 1,2, lo más preferentemente 1, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 kPa, mientras que se mantiene la temperatura fijada a una temperatura de entre 5 °C a 37 °C, 5 °C a 10 °C, 10 °C a 15 °C; 15 °C a 20 °C; 20 °C a 25 °C; 25 °C a 30 °C o 30 °C a 37 °C. Estas condiciones se mantienen durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 16 o 24 horas, preferentemente durante entre 2-4 horas, 4-6 horas, 6-8 horas, 8-12 horas o 12-18 horas. En una realización particularmente preferida, la presión se mantiene por encima de 0,2 kPa cuando la temperatura se ajusta a 15 °C para prevenir la congelación de la muestra. En una realización preferida, la temperatura se mantiene a 15 °C y la presión se ajusta entre 0,5-1 kPa, más preferentemente 0,6-0,9 kPa, de la forma más preferida aproximadamente a 0,8 kPa. Cuando se usa una temperatura fijada más alta, es posible una presión ligeramente inferior sin congelar la muestra y cuando se usa una temperatura fijada más alta, la presión se debería mantener al nivel más alto para prevenir la congelación. Las condiciones se mantienen preferentemente durante un período de tiempo suficiente de tal forma que la velocidad de evaporación haya disminuido, de tal forma que la temperatura de la muestra sea aproximadamente la misma que la externa a la muestra.

Preferentemente, la muestra de conservación no se congela o burbujea/ebulle para formar espuma y pierde disolvente para formar un líquido viscoso o un líquido altamente viscoso.

Retirar disolvente para formar un líquido altamente viscoso

Una etapa posterior del procedimiento de la invención implica retirar el disolvente hasta que se seque la muestra para conservación para formar un líquido altamente viscoso. La muestra ni se congela ni burbujea para formar espuma durante la fase de secado secundaria.

40 Se define un líquido altamente viscoso como un material con un contenido en disolvente de menos de o igual a un 15, 12, 10, más preferentemente un 8, 5, 4, 3, 2 o un 1 % (p/p), medido preferentemente usando un analizador de humedad coulombiométrico de Karl Fischer. El líquido altamente viscoso tiene un contenido suficientemente bajo en disolvente, de tal forma que el principio activo se conserva en un estado estable durante al menos 3, 6, 9, 12 o 24 meses a 4 °C, permitiendo al principio activo retener al menos un 40, 50, 60, preferentemente un 70, 80, 90 o un 95 % de su actividad y/o antigenicidad y/o inmunogenicidad durante este período. Preferentemente, el líquido altamente viscoso tiene una apariencia sólida y/o transparente pero es un vidrio y es capaz de fluir muy lentamente durante un período de 2, 4 o 6 días, preferentemente 2, 3 o 4 semanas, más preferentemente 2, 4, 6, 8, 10 o 12 meses en una posición invertida. El flujo extremadamente lento puede medirse invirtiendo un receptáculo que contiene el líquido altamente viscoso y dejándolo a temperatura ambiente hasta que se observe que el líquido altamente viscoso fluya. En una realización preferida, el líquido altamente viscoso no parecerá fluir después de 2, 4 o 6 días, preferentemente 2, 3 o 4 semanas, más preferentemente 2, 4, 6, 8, 10 o 12 meses en una posición invertida.

55 En una realización de la invención, esto se logra manteniendo las condiciones de presión y temperatura a aquellas aplicadas en la primera etapa de secado evaporativo. Por ejemplo, la presión se mantiene a o por debajo de o por debajo de 2, preferentemente 1,5, 1,2, de la forma más preferible 1, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 kPa, mientras se mantiene temperatura fijada a una temperatura de entre 5 °C y 37 °C, 5 °C a 10 °C, 10 °C a 15 °C; 15 °C a 20 °C; 20 °C a 25 °C; 25 °C a 30 °C; o 30 °C a 37 °C. Para un ajuste de temperatura de 15 °C, se mantiene una presión de 0,5-1 kPa, preferentemente de 0,6-0,9 kPa, de la forma más preferible aproximadamente 0,8 kPa durante entre 4-24 horas, preferentemente 1-4, 4-8, 8-12 o 12-16 horas. Estas condiciones de temperatura y presión se

mantiene durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 18 horas o más para obtener un líquido altamente viscoso con un contenido en disolvente de menos de o igual a un 15, 12, preferentemente un 10, 8, 5, 4, 3, 2 o un 1 % (p/p), medido preferentemente por un analizador de humedad coulombiométrico de Karl Fischer.

5 Otra realización de la invención aumenta la temperatura fijada durante la retirada del disolvente a una temperatura fijada más alta que aquel que se mantiene anteriormente en el procedimiento. Esto permite al disolvente abandonar la muestra a una velocidad más rápida de modo que el procedimiento de la invención se puede completar en un tiempo más corto. Por ejemplo, la temperatura fijada se aumenta por encima de 20 °C, preferentemente entre 5 °C y 37 °C, 5 °C y 10 °C, 10 °C y 20 °C; 20 °C y 30 °C; mientras que la presión se mantiene a o por debajo de 2, preferentemente 1,5, 1,2, de la forma más preferible 1, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 kPa. Estas condiciones de temperatura y presión se mantienen durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 o 18 horas o más, para obtener un sólido con un contenido en disolvente de menos de o igual a un 15, 12, 10, 8, 5, 4, 3, 2 o un 1 % (p/p) preferentemente medido por un analizador de humedad coulombiométrico de Karl Fischer. Esta realización requiere calentar de manera estable al principio activo a la temperatura usada para que el procedimiento se lleve a cabo con éxito.

15 La invención reduce presión fijada durante la retirada del disolvente (etapa c) a una presión fijada más baja que el usado anteriormente en el procedimiento (etapa b). Esto permite al disolvente abandonar la muestra a una velocidad más rápida de tal forma que el procedimiento de la invención se puede completar en un tiempo más corto. También permite una proporción mayor del disolvente que se va a perder. Por ejemplo, la presión fijada se fija a o por debajo de 0,7, 0,6, preferentemente 0,5, 0,4, 0,3, más preferentemente 0,2, 0,15, 0,1, de la forma más preferida 0,08, 0,05, 20 0,02, 0,01, 0,005, 0,002, 0,001 o 0,0005 kPa, mientras que la temperatura se mantiene entre 5 °C y 37 °C, preferentemente entre 10 °C y 20 °C; 20 °C y 30 °C; 30 y 35 °C. Estas condiciones de temperatura y presión se mantienen durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 o 18 horas o más para obtener un sólido con un contenido en disolvente de menos de o igual a un 15, 12, preferentemente un 10, 8, 5, 4, 3, 2 o un 1 % (p/p), preferentemente como se determina por el analizador de humedad coulombiométrico de Karl Fischer (Eur. J. Pharm. Biopharm. (2000) 50; 277-284).

Preferentemente, las etapas b) y c) (o b) sola) se deberían completar en un tiempo igual a o menor de 18 horas, preferentemente 16, 12, 10 horas, de la forma más preferible 8, 6, 5 o 4 horas.

Principio activo

30 El procedimiento de la invención es para conservar un principio activo en el que el principio activo comprende una vacuna que comprende un virus. Es particularmente útil en el caso de principios activos lábiles que comprenden una vacuna que comprende un virus que pierden actividad y/o antigenicidad y/o inmunogenicidad durante otros procedimientos de conservación.

35 El principio activo que comprende una vacuna que comprende un virus que se va a conservar usando un procedimiento de la invención puede comprender un sistema biológico seleccionado del grupo que consiste en células, composiciones subcelulares, bacterias, preparaciones de vesículas de membranas externas y virus, componentes víricos o partículas tipo virus. También puede comprender moléculas, por ejemplo proteínas, péptidos, aminoácidos, ácidos polinucleicos, oligonucleótidos, polisacáridos, oligosacáridos, conjugados polisacárido - proteína, conjugados oligosacárido - proteína.

40 Los ejemplos de agentes activos descritos en el presente documento incluyen sustancias bioactivas tales como sustancias farmacéuticamente eficaces, incluyendo, pero no limitado a, fármacos antiinflamatorios, analgésicos, tranquilizantes, fármacos contra la ansiedad, antiespasmódicos, antidepresivos, antipsicóticos, tranquilizantes, fármacos contra la ansiedad, antagonistas de narcóticos, agentes antiparkinsonianos, agonistas colinérgicos, fármacos quimioterapéuticos, agentes inmunosupresores, agentes antivíricos, agentes antimicrobianos, supresores del apetito, anticolinérgicos, antimétricos, antihistamínicos, agentes antimigraña, vasodilatadores coronarios, 45 cerebrales y periféricos, agentes hormonales, contraceptivos, agentes antitrombóticos, diuréticos, agentes antihipertensivos, fármacos cardiovasculares, opioides y similares.

50 Los agentes adecuados que comprenden una vacuna que comprende un virus también incluyen agentes terapéuticos y profilácticos. Estos incluyen, pero no se limitan a, cualquier modificador biológico terapéuticamente efectivo. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, composiciones subcelulares, células, bacterias, preparaciones vesiculares de membrana externa, virus y moléculas que incluyen pero no se limitan a, lípidos, compuestos orgánicos, proteínas y péptidos (sintéticos y naturales), miméticos de péptidos, hormonas (péptido, esteroide y corticosteroide), polímeros de aminoácidos D y L, oligosacáridos, polisacáridos, nucleótidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos, incluyendo ADN y ARN, híbridos de proteína y ácido nucleico, pequeñas moléculas y análogos fisiológicamente activos de los mismos. Además, los modificadores pueden derivar de fuentes naturales o elaborarse por medios recombinantes o sintéticos e incluyen análogos, agonistas y homólogos.

55 Como se usa en el presente documento, "proteína" se refiere también a péptidos y a polipéptidos. Tales proteínas incluyen, pero no se limitan a, enzimas, compuestos biofarmacéuticos, hormonas de crecimiento, factores de crecimiento, insulina, anticuerpos, tanto fragmentos monoclonales como policlonales de los mismos, interferones,

interleucinas y citocinas.

La invención también abarca agentes terapéuticos basados en ácidos nucleicos que comprenden una vacuna que comprende un virus preparado por los métodos que se describen en el presente documento. Como se usa en el presente documento, "ácidos nucleicos" incluye cualquier ácido nucleico terapéuticamente efectivo conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a, ADN, ARN, y análogos fisiológicamente activos de los mismos. Los nucleótidos pueden codificar genes o puede ser cualquier vector conocido en la técnica de ADN recombinante que incluye, pero no se limita a, plásmidos, retrovirus y virus adenoasociados.

La invención abarca además la conservación de sustancias que son fisiológicamente activas, y vehículos de las mismas. Las composiciones preferibles incluyen inmunógenos tales como vacunas. Las vacunas adecuadas pueden ser para administración oral o pueden ser para inyección después de reconstitución. Las vacunas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, virus vivos y atenuados, antígenos que codifican vectores de nucleótidos, antígenos de tipo proteína, bacterias vivas y atenuadas, polisacárido, oligosacárido, y/o lipopolisacárido, antígenos más adyuvantes y antígenos y/o haptenos acoplados a vehículos. Son particularmente preferidas las vacunas eficaces contra difteria, tétanos, pertussis, botulinum, cólera, Dengue, Hepatitis A, B, C y E, *Haemophilus influenzae* b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, estreptococos de Grupo B, estreptococos de Grupo A, virus del herpes, *Helicobacterium pylori*, gripe, encefalitis japonesa, meningococos A, B, C, Y, W, sarampión, paperas, virus del papiloma, neumococos, virus de la polio, virus de la polio inactivado (VPI - preferentemente que comprende los tipos 1, 2 y 3 como es convencional en la vacuna de la técnica, de la forma más preferible la vacuna de la polio de Salk), rubeola, rotavirus, virus sincitial respiratorio, Shigella, tuberculosis, virus de varicela-zoster, fiebre amarilla y combinaciones de los mismos. El componente antigénico de las vacunas también puede producirse por técnicas de biología molecular para producir péptidos recombinantes o proteínas de fusión que contienen una o más partes de una proteína derivada de un patógeno. Por ejemplo, se ha visto que las proteínas de fusión que contienen un antígeno y la subunidad B de la toxina del cólera inducen una respuesta inmune al antígeno. Sanches y col (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86:481-485. Las vacunas son particularmente adecuadas para su incorporación en una composición de dosificación única. Son estables indefinidamente en condiciones ambientales y se pueden redissolver en un diluyente estéril inmediatamente antes de la inoculación.

En una realización preferida, la composición inmunogénica comprendería polisacáridos capsulares derivados de uno o más de los serogrupos A, C, W-135 e Y de *Neisseria meningitidis*. Una realización preferida adicional comprendería polisacáridos capsulares derivados de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos de polisacárido capsulares de neumococo se seleccionan preferentemente de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12 F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F (de la forma más preferible de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F). Una realización preferida adicional contendría los polisacáridos capsulares PRP de *Haemophilus influenzae* de tipo b. Una realización preferida adicional contendría los polisacáridos capsulares Tipo 5, Tipo 8, 336 o PNAG de *Staphylococcus aureus*. Una realización preferida adicional contendría los polisacáridos capsulares Tipo I, Tipo II, Tipo III y PIA de *Streptococcus epidermidis*. Una realización preferida adicional contendría los polisacáridos capsulares Tipo Ia, Tipo Ic, Tipo II o Tipo III de Estreptococos del Grupo B. Una realización preferida adicional contendría los polisacáridos capsulares de estreptococos del Grupo A, preferentemente comprendiendo además al menos una proteína M y, más preferentemente, múltiples tipos de proteína M.

En una realización de la invención, los polisacáridos bacterianos son de longitud completa, purificándose polisacáridos nativos. En una realización alternativa de la invención, se mide el tamaño de los polisacáridos entre 2 y 20 veces, preferentemente 2-5 veces, 5-10 veces, 10-15 veces o 15-20 veces, de tal forma que los polisacáridos son más pequeños en tamaño para una mayor manejabilidad. Los oligosacáridos se usan en una realización preferida. Los oligosacáridos contienen típicamente entre 2 y 20 unidades de repetición.

Los polisacáridos y oligosacáridos pueden ser no conjugados o conjugados tal y como se describe posteriormente.

Pueden conservarse combinaciones de dos o más de los principios activos anteriores usando el procedimiento de conservación de la invención. Parte o el total de la vacuna puede conservarse usando el procedimiento de conservación de la invención.

Un principio activo preferido a conservarse usando el procedimiento de la invención comprende VPI (una mezcla inactivada de cepas del virus de la polio). El VPI, particularmente el componente de tipo 3, es sensible a las técnicas convencionales de secado por congelación y secado por espuma como se muestra por la pérdida de antígenos después del secado por congelación o por espuma y posterior reconstitución.

VPI se define como virus de la polio inactivado (preferentemente que comprende los tipos 1, 2 y 3 como es típico en la técnica de vacuna, de la forma más preferible la vacuna de la polio Salk). Una dosis de vacuna de VPI contiene 20-80, preferentemente 40 u 80 unidades de D-antígeno de tipo 1 (Mahoney), 4-16, preferentemente 8 o 16 unidades de D-antígeno de tipo 2 (MEF-1) y 20-64, preferentemente 32 o 64 unidades de D-antígeno de tipo 3 (Saukett).

Cuando se seca por el procedimiento de la invención, preferentemente se retiene la antigenicidad de 1, 2 o los 3 de los tipos 1, 2, y 3 del virus de la polio; más preferentemente la antigenicidad de tipo 1; tipo 2; tipo 3; tipo 1 y tipo 2;

tipo 1 y tipo 3; tipo 2 y tipo 3; o tipo 1, tipo 2 y tipo 3 se retiene a un nivel de al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o un 98 % de la antigenicidad de una muestra referencia que no se ha sometido al procedimiento de secado. Esto puede medirse, después de la reconstitución del líquido altamente viscoso en una solución acuosa, por cualquier método adecuado, incluyendo por ELISA usando anticuerpos policlonales y/o monoclonales contra el virus de la polio de tipo 1, 2 y/o 3.

Cuando se seca por el procedimiento de la invención, preferentemente se retiene la antigenicidad de 1, 2 o los 3 de los tipos 1, 2, y 3 del virus de la polio; más preferentemente la antigenicidad de tipo 1; tipo 2; tipo 3; tipo 1 y tipo 2; tipo 1 y tipo 3; tipo 2 y tipo 3; o tipo 1, tipo 2 y tipo 3 se retiene a un nivel de al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o un 98 % de la antigenicidad de una muestra referencia que no se ha sometido al procedimiento de secado. Esto se puede medir, después de la reconstitución del líquido altamente viscoso en una solución acuosa, por cualquier procedimiento adecuado. En un procedimiento preferido, el líquido altamente viscoso se reconstituye en una solución acuosa y se inocula en un animal, preferentemente una rata. Después de un período de tiempo adecuado, se recogen los antisueros de los animales inoculados y se ensaya la seroconversión. Preferentemente se logra una potencia relativa de al menos 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 o 0,9, comparado con una muestra de referencia no secada.

Preferentemente, el VPI se combina con uno o más polisacáridos PRP u oligosacáridos de Hib (*Haemophilus influenzae* tipo b) y/o polisacáridos u oligosacáridos de meningococo A, C, W y/o Y, y/o polisacáridos u oligosacáridos de neumococo. De la forma más preferida, los principios activos comprenden VPI y Hib; VPI y Men C; VPI, Hib y Men C; Hib y Men C; VPI y Men A y C; Hib y Men A y C; VPI, Hib, Men A y C; Hib, Men C e Y; o VPI, Hib, Men C e Y.

Los principios activos particularizados anteriormente pueden comprender también uno o más polisacáridos capsulares de neumococo como se describe a continuación.

En las composiciones anteriores donde se usan polisacáridos, también se pueden emplear oligosacáridos (como se define a continuación).

Aunque estas composiciones pueden ir acompañadas de adyuvante (como se describe posteriormente), preferentemente no van acompañadas de adyuvante, o preferentemente, no comprenden sales de aluminio.

Los polisacáridos u oligosacáridos se conjugan preferentemente con un péptido o proteína transportadora que comprende epítomos de linfocitos T auxiliares (como se describe posteriormente).

Componentes adicionales

Las combinaciones preferidas, secadas por el procedimiento de la invención, se pueden combinar con otros antígenos en una vacuna de combinación la cual se diseca, o es preferentemente una formulación líquida la cual puede usarse para reconstituir los componentes secados. Los antígenos preferidos para combinarse con los principios activos que comprenden una vacuna que comprende un virus incluyen uno o más de toxoide diftérico, toxoide tetánico, pertusis de célula completa (Pw), pertusis acelular (Pa) (como se describe posteriormente) antígeno de superficie de Hepatitis B, virus de la Hepatitis A, polisacáridos de *Haemophilus influenzae* b, polisacáridos de neiseria, proteínas de *N. meningitidis* de serotipo B, polisacáridos de neumococo, proteínas de neumococo o cualquiera de los antígenos de la lista posterior. Los polisacáridos bacterianos se pueden conjugar con una proteína transportadora como por ejemplo el toxoide tetánico, fragmento C del toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM197, pneumolisina, Proteína D (US6342224) como se describe posteriormente.

Los principios activos que comprenden una vacuna que comprende un virus conservado usando el procedimiento de la invención pueden formularse con polisacáridos capsulares derivados de uno o más de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* b, *Streptococcus pneumoniae*, Streptococos del Grupo A, Streptococos del Grupo B, *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermis*. En una realización preferida, la composición inmunogénica comprendería polisacáridos capsulares derivados de uno o más de serogrupos A, C, W-135 e Y de *Neisseria meningitidis*. Una realización preferida adicional comprendería polisacáridos capsulares derivados de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos de polisacáridos capsulares de neumococos se seleccionan preferentemente a partir de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12 F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F (de la forma más preferible de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F). Una realización preferida adicional contendría los polisacáridos capsulares PRP de *Haemophilus influenzae* de tipo b. Una realización preferida adicional contendría los polisacáridos capsulares Tipo 5, Tipo 8, 336 o PNAG de *Staphylococcus aureus*. Una realización preferida adicional contendría los polisacáridos capsulares Tipo I, Tipo II, Tipo III y PIA de *Streptococcus epidermis*. Una realización preferida adicional contendría los polisacáridos capsulares Tipo Ia, Tipo Ic, Tipo II o Tipo III de Estreptococos del Grupo B. Una realización preferida adicional contendría los polisacáridos capsulares de estreptococos del Grupo A, preferentemente comprendiendo además al menos una proteína M y, más preferentemente, múltiples tipos de proteína M.

En una realización de la invención, los polisacáridos bacterianos son de longitud completa, purificándose polisacáridos nativos. En una realización alternativa de la invención se mide el tamaño de los polisacáridos entre 2 y 20 veces, preferentemente 2-5 veces, 5-10 veces, 10-15 veces o 15-20 veces, de tal forma que los polisacáridos son

más pequeños en tamaño para una mayor manejabilidad. Los oligosacáridos se usan en una realización preferida. Los oligosacáridos contienen típicamente entre 2 y 20 unidades de repetición.

5 Tales polisacáridos capsulares pueden ser no conjugados o conjugados con una proteína transportadora como por ejemplo toxoide tetánico, fragmento C del toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM197, pneumolisina, Proteína D (US6342224). La toxina tetánica, toxina diftérica y la pneumolisina se detoxifican por mutación genética y/o preferentemente por tratamiento químico.

10 El conjugado de polisacárido se puede preparar por cualquier técnica de acoplamiento conocida. Por ejemplo, el polisacárido se puede acoplar a través de una unión tioéter. Este procedimiento de conjugación se basa en la activación del polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dietilaminopiridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado puede acoparse por lo tanto directamente o a través de un grupo espaciador a un grupo amino a la proteína transportadora. Preferentemente, el éster de cianato se acopla con hexanodiamina y el polisacárido aminoderivatizado se conjuga con la proteína transportadora usando química de heterologación, requiriendo la formación de la unión tioéter. Tales conjugados se describen en la solicitud publicada del PCT WO 93/15760 Uniformed Services University.

15 Los conjugados se pueden preparar también por procedimientos de aminación reductiva directa como se describe en los documentos US 4365170 (Jennings) y US 4673574 (Anderson). Se describen otros procedimientos en los documentos EP-0-161-188, EP-208375 y EP-0-477508.

20 Un procedimiento adicional requiere el acoplamiento de un polisacárido activado con bromuro de cianógeno derivatizado con azida de ácido adípico (ADH) con la proteína transportadora por condensación de carbodiimida (Chu C. y col Infect. Immunity, 1983 245 256).

25 Los antígenos proteicos de neumococo son aquellas proteínas de Neumococo que quedan expuestas en la superficie externa del neumococo (capaz de ser reconocido por un sistema inmune del huésped durante al menos parte del ciclo vital del neumococo), o son proteínas que el neumococo secreta o libera. De la forma más preferida, la proteína es una toxina, adhesina, transductor de señales de 2 componentes o lipoproteína de *Streptococcus pneumoniae* o fragmentos de los mismos. Particularmente las proteínas preferidas incluyen, pero no se limitan a: pneumolisina (preferentemente detoxificada por tratamiento químico o mutación) [Mitchell y col. Nucleic Acid Res. 1990 Jul 11; 18 (13):4010 "Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2.", Mitchell y col. Biochim Biophys Acta 1989 Jan 23; 1007 (1):67-72 "Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*: rapid purification and biological properties.", WO 96/05859 (A. Cyanamid), WO 90/06951 (Paton y col), WO 99/03884 (NAVA)]; PspA y variantes de delección transmembrana de la misma (US 5804193 - Briles y col); PspC y variantes de delección transmembrana de la misma (WO 97/09994 - Briles y col); PsaA y variantes de delección transmembrana de la misma (Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec; 64 (12) :5255-62 "Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*"); proteínas de unión a colina de neumococo y variantes de delección transmembrana de las mismas; CbpA y variantes de delección transmembrana de la misma (WO 97/41151; WO 99/51266); gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (Infect. Immun. 1996 64:3544); HSP70 (WO 96/40928); PcpA (Sanchez-Beato y col. FEMS *Microbiol Lett* 1998, 164:207-14); proteína de tipo M, (EP 0837130) y adhesina 18627, (EP 0834568). Los antígenos proteicos de neumococo preferidos adicionales son aquellos que se describen en el documento WO 98/18931, particularmente aquellos seleccionados en los documentos WO 98/18930 y PCT/US99/30390.

40 Las proteínas de *Neisseria* preferidas para ser formuladas con la composición inmunogénica de la invención incluyen TbpA (WO 93/06861; EP 586266; WO 92/03467; US 5912336), TbpB (WO 93/06861; EP 586266), Hsf (WO 99/31132), NspA (WO 96/29412), Hap (PCT/EP 99/02766), PorA, PorB, OMP85 (también conocido como D15) (WO 00/23595), PilQ (PCT/EP 99/03603), PldA (PCT/EP 99/06718), FrpB (WO 96/31618 ver SEQ ID n.º 38), FrpA o FrpC o una parte conservada en común a ambas de al menos 30, 50, 100, 500, 750 aminoácidos (WO 92/01460), LbpA y/o LpbB (PCT/EP 98/05117; Schryvers y col Med. Microbiol. 1999 32:1117), FhaB (WO 98/02547), HasR (PCT/EP 99/05989), lipo02 (PCT/EP 99/08315), MltA (WO 99/57280) y ctrA (PCT/EP 00/00135). Las proteínas de *Neisseria* se añaden preferentemente en forma de proteínas purificadas como parte de una preparación de membranas externas.

50 La vacuna se formula preferentemente con antígenos que proporcionan protección contra una o más infecciones por *Difteria*, *Tétanos* y *Bordetella pertussis*. En cuanto al componente de pertusis, se pueden matar *B. Pertussis* de célula completa (Pw) o pertusis acelulares (Pa) los cuales contienen al menos (preferentemente 2 o hasta 3) a partir de PT, FHA y pertactina de 69 kDa. Otras vacunas acelulares contienen también aglutinógenos como por ejemplo Fim 2 y Fim 3, y estas vacunas se contemplan también para uso en la invención. Típicamente, los antígenos que proporcionan protección contra Difteria y Tétanos son el toxoide diftérico y el toxoide tetánico. Los toxoides son toxinas inactivadas químicamente (por ejemplo, después de un tratamiento con formaldehído), o toxinas inactivadas por la introducción de una o más mutaciones puntuales.

60 Alternativamente, el líquido altamente viscoso de la invención se puede proporcionar en forma de kit con el vidrio del líquido altamente viscoso en un recipiente y DTPa y DTPw en otro recipiente. Tales kits pueden comprender por ejemplo una jeringa de doble cámara con los componentes secado y líquido contenidos en la misma jeringa pero en diferentes cámaras. El componente secado se reconstituye luego con la vacuna líquida inmediatamente anterior a la

inyección en forma de una vacuna única. De esta forma, por ejemplo, la composición de líquido altamente viscoso de la invención se reconstituye con la vacuna líquida de DTPa DTPw (preferentemente extemporáneamente) y se administra en forma de una vacuna única. La vacuna de DTPa o DTPw va acompañada típicamente de adyuvante al menos en parte con hidróxido de aluminio (por ejemplo vacunas Infanrix® y Tritanrix® de GlaxoSmithKline Biologicals S.A.).

La vacuna puede comprender opcionalmente también uno o más antígenos que pueden proteger al huésped contra *Haemophilus influenzae* no tipificables, RSV y/o uno o más antígenos que pueden proteger a un huésped contra el virus de la gripe.

Antígenos proteicos preferidos de *H. influenzae* no tipificables incluyen proteína Fimbrina (US 5766608) y fusiones que comprenden péptidos (por ejemplo Fusión LB1) (US 5832464-Ohio State Research Foundation), OMP26, P6, proteína D, TbpA, TbpB, Hia, Hmw1, Hmw2, Hap y D 15.

Los antígenos del virus influenza preferidos incluyen virus completos, vivos o activados, virus de la gripe partido, crecido en huevos o en células MDCK o células Vero o virosomas de la gripe completos (como se describe en R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) o proteínas purificadas o recombinantes de los mismos, como por ejemplo proteínas HA, NP, NA o M o combinaciones de las mismas.

Los antígenos del VSR (virus sincitial respiratorio) preferidos incluyen la glicoproteína F, la glicoproteína G, la proteína HN, la proteína M o derivados de las mismas.

Se debería apreciar que las composiciones antigénicas de la invención pueden comprender uno o más polisacáridos capsulares a partir de una única especie de bacteria. Las composiciones antigénicas pueden comprender también polisacáridos capsulares derivados a partir de una o más especies de bacterias.

Composiciones y vacunas inmunogénicas

Un aspecto adicional de la invención incluye composiciones o vacunas inmunogénicas que comprenden el líquido altamente viscoso obtenido mediante el procedimiento de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable

Preferentemente, la composición o vacuna inmunogénica contiene una cantidad de un adyuvante suficiente para mejorar la respuesta inmune al inmunógeno. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, sales de aluminio, mezclas de escualeno (SAF-1), péptido de muramilo, derivados de saponina, preparaciones de paredes celulares de micobacterias, lípido monofosforílico A, derivados del ácido micólico, agentes tensoactivos de copolímeros en bloques no iónicos, Quil A, subunidad B de la toxina del cólera, polifosfazeno y derivados y complejos inmunoestimulantes (ISCOM) como por ejemplo aquellos que se describen en Takahashi y col. (1990) Nature 344:873-875. Se pueden usar componentes mitogénicos del adyuvante de Freund para la producción de anticuerpos en animales.

Como con las composiciones o vacunas inmunogénicas, las cantidades de inmunógenos inmunológicamente efectivas se deben determinar empíricamente. Los factores que se deben considerar incluyen la inmunogenicidad, si el inmunógeno se complejará o no con, o se unirá covalentemente a un adyuvante o a una proteína transportadora u a otro vehículo, ruta de administraciones y el número de dosis inmunizantes que se van a administrar. Tales factores se conocen en la técnica de la vacuna y está bien dentro de la habilidad de los inmunólogos hacer tales determinaciones sin experimentación indebida.

El principio activo puede estar presente en concentraciones que varían en el líquido altamente viscoso o vacuna de la invención. Típicamente, la concentración mínima de la sustancia es una cantidad necesaria para lograr su uso propuesto, mientras que la concentración máxima es la cantidad máxima que permanecerá en disolución u homogéneamente suspendida dentro de la mezcla inicial. Por ejemplo, la cantidad mínima de un agente terapéutico es preferentemente una que proporcionará una única dosis terapéuticamente eficaz. Para sustancias bioactivas, la concentración mínima es una cantidad necesaria para bioactividad en la reconstitución, y la concentración máxima es al punto al cual no se puede mantener una suspensión homogénea. En el caso de unidades de dosis únicas, la cantidad es aquella de una única aplicación terapéutica. Generalmente, se espera que cada dosis comprenderá de 1 a 100 µg de antígeno proteico, preferentemente de 5 a 50 µg y de la forma más preferible de 5 a 25 µg. Las dosis preferidas de polisacáridos bacterianos son de 10 a 20 µg, de 10 a 5 µg, de 5 a 2,5 µg o de 2,5 a 1 µg. La cantidad preferida de la sustancia varía de unas sustancias a otras, pero es fácilmente determinable por uno de los expertos en la materia.

Líquido altamente viscoso que comprende un principio activo

Otro aspecto de la invención es un líquido altamente viscoso que comprende un principio activo, el cual es obtenible preferentemente o se obtiene usando un procedimiento de la invención. El principio activo retiene preferentemente su actividad y/o antigenicidad y/o inmunogenicidad después del secado usando el procedimiento de la invención y posterior reconstitución. Preferentemente se retiene al menos un 40, 50, 60, 70, 80, 90 o un 95 % de la actividad del principio activo, antigenicidad o inmunogenicidad.

Los líquidos altamente viscosos de la invención comprenden preferentemente un poliol que forma vidrio seleccionado del grupo que consiste en glucosa, maltulosa, iso-maltulosa, lactulosa, sacarosa, maltosa, lactosa, sorbitol, iso-maltosa, maltitol, lactitol, palatinit, trehalosa, rafinosa, estaquirosa, melezitosa y dextrano.

5 El líquido altamente viscoso de la invención puede contener cualquiera de los principios activos que comprenden una vacuna que comprenden un virus descrito anteriormente. El principio activo conservado por el líquido altamente viscoso puede comprender un sistema biológico, por ejemplo, virus. Puede comprender alternativamente o además moléculas, por ejemplo proteínas, péptidos, aminoácidos, ácidos polinucleicos, oligonucleótidos, polisacáridos, oligosacáridos, conjugados polisacárido-proteína, conjugados oligosacárido-proteína. Puede comprender también combinaciones que comprenden dos o más de los principios activos anteriores.

10 Las realizaciones preferidas incluyen un líquido altamente viscoso obtenido por un método de la invención en el que el principio activo es o comprende una vacuna o componente de vacuna. Los componentes preferidos de la vacuna se describen anteriormente e incluyen VPI, más preferentemente VPI y polisacáridos bacterianos, preferentemente polisacáridos u oligosacáridos de *Haemophilus influenzae* b y *Neisseria meningitidis* A, C W e Y.

15 Los componentes de vacuna preferidos incluyen VPI (una mezcla inactivada de cepas del virus de la polio). Preferentemente, el VPI se combina con uno o más polisacárido PRP de Hib y/o polisacáridos de meningococo A, C W y/o Y y/o polisacáridos de neumococo (como se ha descrito anteriormente), más preferentemente VPI y Hib; VPI y Men C; VPI, Hib y Men C; Hib y Men C; VPI y Men A y C; Hib y Men A y C; VPI, Hib, Men A y C; Hib, Men C e Y; o VPI, Hib, Men C e Y.

20 En las composiciones anteriores donde se usan polisacáridos, también se pueden usar polisacáridos (como se ha definido anteriormente).

Aunque estas composiciones pueden ir acompañadas de adyuvante (como se ha descrito anteriormente), preferentemente no van acompañadas de adyuvante, o preferentemente, no comprenden sales de aluminio.

Los polisacáridos u oligosacáridos se conjugan preferentemente con un péptido o proteína transportadora que comprende epítomos de linfocitos T auxiliares (como se ha descrito anteriormente).

25 El líquido altamente viscoso de la invención se combina preferentemente con otros antígenos en una vacuna de combinación, la cual se seca opcionalmente, o preferentemente formulaciones líquidas, las cuales se pueden usar para reconstituir los componentes secados. Los antígenos preferidos para ser combinados con los contenidos del recipiente de la invención incluyen uno o más de toxoide diftérico, toxoide tetánico, pertusis de célula completa (Pw), pertusis acelulares (Pa) (como se ha descrito anteriormente), antígeno de superficie de Hepatitis B, polisacáridos de neumococo, proteínas de neumococo, polisacáridos de neiseria, proteínas de neiseria. Los polisacáridos bacterianos se pueden conjugar con una proteína transportadora como por ejemplo el toxoide tetánico, fragmento del toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM197, pneumolisina, Proteína D (US 6342224) como se ha descrito anteriormente.

30 Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para elaborar una vacuna que comprende la etapa de reconstitución del líquido altamente viscoso en una solución acuosa. En una realización preferida, la solución acuosa comprende los antígenos toxoide diftérico, toxoide tetánico y Pertusis (acelular o célula completa) y adicionalmente comprende además antígeno de superficie de Hepatitis B. La vacuna de DTP va opcionalmente al menos en parte acompañada de adyuvante con una sal de aluminio, preferentemente hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.

35 Otra realización de la invención es un kit que comprende el líquido altamente viscoso de la invención contenido en un primer recipiente y una vacuna que comprende DTP líquido (acelular o célula completa) en un segundo recipiente. Puede usarse una jeringa de doble cámara como se ha descrito anteriormente.

40 Se proporcionan divulgaciones adicionales dentro de los siguientes párrafos numerados:

Párrafo 1. Un procedimiento para conservar un agente activo que comprende las etapas de:

- 45 a) preparar una muestra para conservación disolviendo/suspendiendo un principio activo en una solución de un agente estabilizante;
- b) someter la muestra para conservación a unas condiciones de temperatura y presión tales que la muestra para conservación pierda disolvente por evaporación, sin congelación o burbujeo asociado a la formación de espuma, para formar un líquido viscoso.

Párrafo 2. El procedimiento del párrafo 1, que comprende además una etapa de:

- 50 c) someter además la muestra para conservación a unas condiciones de temperatura y presión tales que el líquido viscoso se seque para formar un líquido altamente viscoso.

Párrafo 3. El procedimiento del párrafo 1 o 2 en el que la presión se reduce a 2000 Pa o por debajo durante la etapa b).

Párrafo 4. El procedimiento de los párrafos 1-3 en el que la temperatura externa a la muestra para conservación

está entre 5 °C y 37 °C durante la etapa b).

Párrafo 5. El procedimiento de los párrafos 2-4 en el que la temperatura externa a la muestra para conservación está entre 5 °C y 37 °C durante la etapa c).

5 **Párrafo 6.** El procedimiento de los párrafos 2-5 en el que la temperatura externa a la muestra para conservación es más alta durante la etapa c) que lo que lo es en la etapa b).

Párrafo 7. El procedimiento del párrafo 6 en el que la temperatura externa a la muestra para conservación se aumenta por encima de 20 °C durante la etapa c).

Párrafo 8. El procedimiento de los párrafos 2-7 en el que la presión se reduce en la etapa
c) comparado con la presión durante la etapa b).

10 **Párrafo 9.** El procedimiento del párrafo 8, en el que la presión se reduce a 100 Pa o por debajo durante la etapa c).

Párrafo 10. El procedimiento de los párrafos 1-9 en el que la etapa b) se completa en menos de 4 horas.

Párrafo 11. El procedimiento de los párrafos 2-10 en el que las etapas b) y c) se completan en menos de 12 horas.

15 **Párrafo 12.** El procedimiento de los párrafos 1-11 en el que el agente estabilizante comprende un poliol formador de vidrio, seleccionado del grupo que consiste en glucosa, maltulosa, iso-maltulosa, lactulosa, sacarosa, maltosa, lactosa, sorbitol, iso-maltosa, maltitol, lactitol, palatinit, trehalosa, rafinosa, estaquirosa, melezitosa y dextrano.

Párrafo 13. El procedimiento del párrafo 12 en el que el agente estabilizante es sacarosa.

20 **Párrafo 14.** El procedimiento de los párrafos 12-13 en el que la concentración de agente estabilizante es menos de un 15 %.

Párrafo 15. El procedimiento de los párrafos 1-14 en el que la muestra para conservación comprende rojo de fenol.

Párrafo 16. El procedimiento de los párrafos 1-15, en el que la muestra para conservación se seca en un recipiente con una superficie interior repelente de disolvente.

25 **Párrafo 17.** El procedimiento de los párrafos 1-16 en el que el principio activo comprende una molécula que se selecciona a partir del grupo que consta de proteína, péptido, aminoácido, polinucleótido, oligonucleótido, polisacárido, oligosacárido, conjugado polisacárido-proteína y conjugado oligosacárido-proteína.

30 **Párrafo 18.** El procedimiento de los párrafos 1-16 en el que el principio activo comprende un sistema biológico que se selecciona a partir del grupo que consta de células, composiciones subcelulares, bacterias, componentes virales y partículas de tipo vírico.

Párrafo 19. El procedimiento del párrafo 18, en el que el principio activo comprende VPI (virus de la polio inactivado).

Párrafo 20. El procedimiento de los párrafos 18-19 en el que el principio activo comprende un polisacárido u oligosacárido de Hib (*Haemophilus influenzae* de tipo b)

35 **Párrafo 21.** El procedimiento de los párrafos 18-20 en el que el principio activo comprende un polisacárido u oligosacárido de *Neisseria meningitidis* C.

Párrafo 22. El procedimiento de los párrafos 1-21 en el que el principio activo comprende una vacuna.

Párrafo 23. Un líquido altamente viscoso que comprende un principio activo en el que se conserva la antigenicidad o actividad del principio activo.

40 **Párrafo 24.** El líquido altamente viscoso del párrafo 23 que puede obtenerse por el procedimiento de las reivindicaciones 1-22.

Párrafo 25. El líquido altamente viscoso del párrafo 23 o 24 que comprende un poliol formador de vidrio seleccionado a partir de un grupo que consta de glucosa, maltulosa, iso-maltulosa, lactulosa, sacarosa, maltosa, lactosa, sorbitol, iso-maltosa, maltitol, lactitol, palatinit, trehalosa, rafinosa, estaquirosa, melezitosa y dextrano.

45 **Párrafo 26.** El líquido altamente viscoso del párrafo 25 en el que el poliol formador de vidrio es sacarosa.

Párrafo 27. El líquido altamente viscoso de los párrafos 23-26, en el que el principio activo comprende una molécula que se selecciona a partir del grupo que consta de proteína, péptido, aminoácido, polinucleótido, oligonucleótido, polisacárido, oligosacárido, conjugado polisacárido-proteína y conjugado oligosacárido proteína.

5 **Párrafo 28.** El líquido altamente viscoso de los párrafos 23-27, en el que el principio activo comprende un sistema biológico que se selecciona a partir del grupo que consta de células, composiciones subcelulares, bacterias, componentes víricos y partículas de tipo vírico.

Párrafo 29. El líquido altamente viscoso de los párrafos 23-28 en el que el principio activo comprende una vacuna.

Párrafo 30. El líquido altamente viscoso de los párrafos 23-29 en el que el principio activo comprende VPI.

10 **Párrafo 31.** El líquido altamente viscoso de los párrafos 23-30 en el que el principio activo comprende un polisacárido u oligosacárido bacteriano.

Párrafo 32. El líquido altamente viscoso del párrafo 31 en el que el principio activo comprende un polisacárido u oligosacárido de Hib (*Haemophilus Influenzae* b), preferentemente conjugado con una proteína transportadora.

15 **Párrafo 33.** El líquido altamente viscoso de los párrafos 23-32 en el que el principio activo comprende un polisacárido u oligosacárido del serogrupo C de *Neisseria meningitidis*, preferentemente conjugado con una proteína transportadora.

Párrafo 34. El líquido altamente viscoso de los párrafos 23-33 contenido dentro de un recipiente con una superficie interior repelente de disolvente.

20 **Párrafo 35.** Una composición o vacuna inmunogénica que comprende el líquido altamente viscoso de los párrafos 23-24 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Párrafo 36. Un procedimiento para elaborar una vacuna que comprende la etapa de reconstituir el líquido altamente viscoso de los párrafos 23-35 en una solución acuosa.

Párrafo 37. El procedimiento del párrafo 36, en el que la solución acuosa comprende antígeno diftérico, antígeno tetánico y antígenos de Pertusis (acelular o células completas).

25 **Párrafo 38.** El procedimiento del párrafo 37 donde la vacuna de DTP está al menos en parte acompañada de adyuvante con hidróxido de aluminio.

Párrafo 39. Un kit que comprende el líquido altamente viscoso de los párrafos 23-34 contenido en un primer recipiente y un componente de vacuna líquido en un segundo contenedor.

Ejemplos

30 Los ejemplos posteriores se llevan a cabo usando técnicas convencionales que son bien conocidas y de rutina para los expertos en la materia, excepto donde se describa en detalle de otra manera. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

Ejemplo1. Establecimiento de las condiciones de congelación

35 Las muestras se elaboraron disolviendo sacarosa en agua para dar soluciones al 1 %, 5 %, 10 % y a un 20 %. Las muestras se pusieron en un secador por congelación Heto Drywinner 8-85 en el que la temperatura en la bandeja se puede regular hasta a 1 °C, la temperatura final del condensador es -85 °C, la presión se regula con una válvula de sangrado y 6 termopares están disponibles para medirla temperatura del producto. La temperatura fijada en la bandeja se mantuvo a 15 °C durante todo el procedimiento. La presión se redujo inicialmente a 20 kPa y se mantuvo a este nivel durante 10 minutos antes de reducir la presión adicionalmente a 5000 Pa, 500 Pa, 250 Pa, 75 Pa, 40 Pa y 20 Pa. Cada nivel de presión se mantuvo durante 20 minutos para permitir que temperatura se equilibrase y se leyó la temperatura de la muestra usando un termopar. Los termopares se pusieron unidos a las muestras con diferentes concentraciones de sacarosa y las temperaturas registradas en la tabla 1 son valores medios de las temperaturas.

Resultados

45 Todas las muestras se congelaron entre 166 y 111 Pa, sin tener en cuenta la concentración de sacarosa presente. Las temperaturas medidas a diferentes presiones estuvieron muy próximas a aquellas predichas a partir de la curva de triple punto. Por lo tanto la presencia de sacarosa no tiene un gran efecto sobre la temperatura de las muestras a diferentes presiones.

50 Para evitar la congelación de la muestra, la presión se debería mantener por encima de 200 Pa para una temperatura fijada en la bandeja de 15 °C. A temperaturas inferiores la presión se debería mantener a un nivel más

alto mientras que el uso de una temperatura más alta permitiría que la presión se redujera aún más sin que las muestras se congelasen.

Tabla 1

Presión	Temperatura medida	Temperatura teórica	Líquido/congelado
10 ⁵ Pa	15 °C		líquido
5000 Pa	15 °C		líquido
500 Pa	1 °C	1 °C	líquido
250 Pa	-5 °C	-7 °C	líquido
75 Pa	-21 °C	-21 °C	congelado
40 Pa	-22 °C	-27 °C	congelado
20 Pa	-27 °C	-32 °C	congelado

5 Ejemplo 2. Procedimiento para secar sin congelar y sin formación de espuma

Se prepararon muestras para conservación que contienen un 5 %, 10 %, 15 % y un 25 % de sacarosa y se añadieron a viales. Las muestras se pusieron en un secador por congelación a una temperatura fijada de 15 °C durante todo el procedimiento. La presión se redujo inicialmente a 20 kPa y se mantuvo a este nivel durante 10 minutos para permitir la desgasificación antes de reducir aún más la presión. La presión se redujo aún más a 800 Pa durante dos a tres horas, tiempo durante el cual los termopares del interior de las muestras mostraron que la temperatura de la muestra se redujo a 4 °C debido al enfriamiento evaporativo. Después de 2 a 3 horas, la temperatura de las muestras volvió a 15 °C, indicando que la evaporación en estas condiciones de temperatura y presión era prácticamente completa. Durante esta etapa del procedimiento, la muestra no ebulló para formar espuma ni se congeló, de tal forma que un principio activo dentro de la muestra queda expuesto a la menor tensión (estrés) posible.

Se alcanzó un secado de las muestras aún mayor al reducir la presión aún más a 10 Pa mientras se conservaba la temperatura fijada a 15 °C. Estas condiciones se mantuvieron durante unas 10 a 16 horas adicionales. Durante esta fase, la temperatura de la muestra permaneció a 15 °C ya que la velocidad de evaporación era lenta. Tuvo lugar un secado adicional y la muestra resultante tenía un aspecto sólido. Si la muestra se colocaba en su lado, los contenidos de la muestra descendieron muy lentamente, durante un período de días, mostrando que la muestra es un vidrio líquido de elevada viscosidad. La Figura 1 muestra el aspecto del líquido de elevada viscosidad.

Ejemplo 3. Retención de inmunogenicidad frente al VPI después del secado sin congelación o formación de espuma.

Tales muestras no se han sometido a tensiones asociadas con el burbujeo que acompaña a la formación de espuma o congelación. Los experimentos se llevaron a cabo para determinar si este procedimiento producía un elevado nivel de retención de antígeno cuando se usaba para secar VPI.

Se llevaron a cabo tres experimentos por separado en los que se resuspendió el VPI en una solución acuosa con un 10 % de sacarosa o un 10 % de trehalosa en forma de agente estabilizador. Las muestras se colocaron en viales recubiertos de silicona, los cuales se colocaron en un secador por congelación Heto Drywinner 8-85 y la temperatura se ajustó a 15 °C. La presión se redujo inicialmente a 3500 Pa para desgasificar la muestra. Después de 10 minutos, la presión se redujo aún más a 800 Pa y se mantuvo a este nivel durante dos horas. Durante este período la temperatura fijada se mantuvo a 15 °C y se controló la temperatura dentro de la muestra. Como el agua se evaporó de la muestra, la temperatura cayó a 4 °C pero hacia el final de las dos horas la temperatura volvió a los 15 °C ya que la velocidad de evaporación disminuyó. En estas condiciones no se dieron ni burbujeo ni formación de espuma. La presión se redujo entonces aún más a 10 Pa, y se mantuvieron estas condiciones durante 16 horas más en los dos primeros experimentos y durante 10 horas más en el tercer experimento.

Las muestras se reconstituyeron en agua y se usó un ELISA para calcular la retención de antigenicidad de las tres cepas del virus de la polio. El anticuerpo monoclonal contra el VPI de tipo 3 se usó en un ELISA para calcular el grado de retención de antígeno en la muestra reconstituida secada por congelación, comparado con una muestra referencia que no se había congelado. Los resultados se presentaron como porcentaje de la lectura dada para un ejemplo, el cual no había sufrido un procedimiento de secado.

Resultados

Las muestras secadas tenían un aspecto sólido, sin embargo, parecían estar en forma de un líquido/vidrio altamente viscoso ya que, durante un período de días, la muestra secada era capaz de fluir si el recipiente se invertía.

Tabla 2. Retención de antígeno VPI de tipo 3 como se determina por ELISA usando un anticuerpo monoclonal (secado sin congelación o formación de espuma).

Formulación	1 ^{er} experimento (ciclo de 18 horas)	2 ^o experimento (ciclo de 18 horas)	3 ^{er} experimento (ciclo e 12 horas)
Sin azúcar	0 %		
2,5 % de sacarosa	0 %		
10 % de sacarosa	75 %	78 %	91 %
10 % de trehalosa	82 %	79 %	93 %

5 Estos niveles de retención de antígeno VPI de tipo 3 se comparan muy favorablemente con los resultados de secado por congelación mostrados posteriormente donde generalmente se encontraron valores muy bajos en el mismo formato de ELISA cuando se usó un anticuerpo monoclonal contra el tipo 3.

Tabla 3. Retención de antígenos VPI de tipo 1, 2 y 3 como se determina por ELISA usando anticuerpos monoclonales y policlonales (secado por congelación).

Procedimiento de secado	Contenido en polioles	ELISA-tipo 1/2/3 %	
		Policlonal	Monoclonal
Secado por congelación	3,15 % de sacarosa	46/49/58*	19/25/0
Secado por congelación	10 % de sacarosa	47/43/58	25/0/0

* El secado por congelación del experimento en presencia de un 3,15 % de sacarosa se repitió cinco veces y los resultados mostrados son de un experimento representativo

10 **Ejemplo 4. Estabilidad de almacenamiento a largo plazo de VPI secado almacenado en forma de un líquido/vidrio altamente viscoso.**

Se almacenó VPI secado usando el procedimiento que se describe en el Ejemplo 3 a 4 °C durante 9 meses. Las muestras se reconstituyeron en agua con NaCl 150 mM y se usó un ELISA para calcular la retención de antigenicidad de las tres cepas del virus de la polio. Se usaron tres anticuerpos monoclonales, uno contra cada cepa, en ELISA separados para calcular el grado de retención de antígeno en la muestra almacenada reconstituida. Se había llevado a cabo un ELISA similar sobre muestras reconstituidas a partir del mismo lote previo al almacenamiento. Todos los resultados se compararon con una muestra referencia que no se había secado. Los resultados se presentan en forma de porcentaje de la lectura dada para una muestra, la cual no había sufrido un procedimiento de secado.

20 **Resultados**

Tabla 4. Retención de antígenos VPI después del almacenamiento en forma de líquido viscoso durante 9 meses

Tratamiento	ELISA de Tipo 1	ELISA de Tipo 2	ELISA de Tipo 3
Secado/reconstituido No almacenado	72 %	75 %	88 %
Secado/reconstituido 9 meses a 4 °C	70 %	94 %	90 %

Por lo tanto, el VPI que se ha secado por el procedimiento que se describe en el Ejemplo 3 se almacena a 4 °C durante al menos 9 meses sin pérdida de antigenicidad.

25 **Ejemplo 5. Comparación de la inmunogenicidad *in vivo* de VPI después del secado para formar un líquido altamente viscoso y reconstitución comparada con el VPI no secado.**

Se inocularon grupos de 10 ratas Wistar con varias diluciones de VPI, las cuales se habían secado en presencia de sacarosa al 10 % para formar un líquido altamente viscoso usando el procedimiento que se describe en el Ejemplo 2 y se reconstituyó. Se inocularon grupos adicionales de 10 ratas Wistar con muestras de referencia de VPI, las cuales se habían preparado de la misma forma, pero no se habían secado.

Después de 21 días, se tomaron los sueros de todas las ratas y los sueros se sometieron a ensayo en ensayos de inmunoprecipitación separados usando virus de la polio de Tipo 1, Tipo 2 y Tipo 3.

35 Los resultados se muestran en la tabla 5 que contiene: - a) el número de ratas que responden para cada dilución de VPI, b) la DE₅₀, la cual es la dosis que se requiere para asegurar que se seroconvierte el 50 % de las ratas como se ha calculado por el ensayo de inmunoprecipitación y c) la potencia relativa del VPI secado y reconstituido comparado

con el VPI de referencia no secado.

Tabla 5. Inmunogenicidad de VPI después de secar para formar un líquido de alta viscosidad (JLE017/05) y reconstitución comparado con el VPI de referencia no secado (JLE097)

Muestra	No diluida	Número de ratas que responden			DE50	PR Potencia relativa
		1/1,25	1/3,125	1/7,81		
JLE017/05						
Tipo 1	10	9	6	5	6,37	0,956
Tipo 2	6	4	3	3	7,14	0,825
Tipo 3	6	8	2	1	18,18	1,051
JLE097						
Tipo 1	10	10	10	7	3,33	1,120
Tipo 2	8	6	5	2	3,12	0,951
Tipo 3	7	6	4	1	16,91	1,172
Referencia						
Tipo 1		10	8	4	6,37	
Tipo 2		7	5	2	2,93	
Tipo 3		5	3	0	22,57	

5 JLE017/05 es un lote de VPI que se secó para formar un líquido altamente viscoso y posteriormente se reconstituyó. El JLE097 es la referencia no secada.

La tabla 5 muestra que el número de ratas que responden inoculadas con cada dilución de VPI es similar entre los dos lotes de VPI secado y reconstituido y la muestra de referencia no secada. En general, el VPI de Tipo 1 mostró la mejor respuesta inmune, mostrando el Tipo 2 una respuesta inmune en apenas unas pocas ratas. El Tipo 3 mostró la respuesta inmune más débil.

10 El procedimiento de secado para formar un líquido altamente viscoso no altera la capacidad del VPI para dar anticuerpos por inmunoprecipitación *in vivo*. Una lectura de potencia relativa (PR) de 1,0 indica que la muestra desencadena una respuesta equivalente a la de la muestra de referencia. Ambas muestras secadas producen lecturas de PR de casi 1,0 para los tres tipos del virus de la polio, indicando que el procedimiento de secado no afecta a la capacidad de la muestra para desencadenar una respuesta inmune.

15 **Ejemplo 6. Efecto del secado para formar un líquido altamente viscoso usando sacarosa o trehalosa a modo de agente estabilizante sobre la capacidad del VPI para desencadenar una respuesta inmune por inmunoprecipitación *in vivo***

20 Se inocularon grupos de 10 ratas Wistar con VPI, el cual se había secado en presencia de sacarosa al 10 % o trehalosa al 10 % como se describe en el Ejemplo 2, y luego se reconstituyó. Se inocularon grupos adicionales de 10 ratas Wistar con una cantidad equivalente de VPI que no se había secado, como muestras de referencia.

Después de 21 días, se recogieron los sueros de todas las ratas y se usó un ensayo de inmunoneutralización, como se describe en el Ejemplo 5, para calcular la cantidad de anticuerpo inmunoneutralizante que se había liberado contra el virus de la polio de Tipo 1, Tipo 2 y Tipo 3.

25 Las potencias relativas se calcularon para cada muestra comparando la respuesta inmune con la desencadenada por la muestra de referencia no secada.

Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Comparación de secado en sacarosa y en trehalosa

Número de lote	Azúcar presente	Potencia relativa <i>in vivo</i> Tipo 1/Tipo 2/Tipo 3	% de humedad de Karl Fischer	Duración (horas)
JLE017	10 % de trehalosa	0,95/0,82/1,05	n. d.	7
31C03/01	10 % de sacarosa	0,69/1,20/0,97	4,6 %	18
31C03/02	10 % de trehalosa	0,60/0,94/0,9	11,5 %	18
03D02/01	10 % de sacarosa	0,74/1,05/0,96	5,9 %	12
03D02/02	10 % de trehalosa	0,58/0,98/1,06	10,6 %	12

La cantidad de agua que queda en las muestras fue inferior cuando se usó sacarosa como agente estabilizante con una humedad remanente de aproximadamente un 5 % comparado con aproximadamente un 10 % cuando se usa trehalosa como agente estabilizante medido por un analizador de humedad coulombiométrico de Karl Fischer.

- 5 Tanto la trehalosa como la sacarosa resultaron efectivos al estabilizar el VPI durante el procedimiento de secado, de tal forma que el VPI reconstituido dio lecturas de potencia relativa que se aproximaban a 1,0 para la mayoría de los diferentes tipos de virus de la polio. Las potencias relativas resultaron particularmente buenas para el virus de la polio de Tipo 3, el cual pierde su inmunogenicidad relativamente con facilidad.

Ejemplo 7: Medida de la humedad por Karl Fischer

- 10 El análisis se llevó a cabo en un analizador de Karl Fischer (Aqua 30.00 - Elektrochemie Halle). La muestra se pesó fuera y se colocó en el horno a una temperatura de 80 °C. La muestra se desplazó con nitrógeno gas y luego se añadió a un reactivo hidranal (Riedel de Hahn) para llevar a cabo el análisis por coulombiometría.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para conservar un principio activo que comprende las etapas de:
 - a) preparar una muestra para conservación disolviendo/suspendiendo un principio activo en una solución de un agente estabilizante;
 - 5 b) someter la muestra para conservación a una condición de temperatura entre 5 °C y 37 °C y unas condiciones de presión por debajo de 2 kPa de manera que la muestra para conservación pierda disolvente por evaporación, sin congelación o burbujeo implicado en la formación de espuma, para formar un líquido viscoso, en el que un líquido viscoso es el producto de la fase primaria de la retirada del disolvente;
 - 10 c) someter además la muestra para conservación a una condición de temperatura entre 5 °C y 37 °C y tales condiciones de presión de manera que el líquido viscoso se seque para formar un líquido altamente viscoso en el que la presión se reduce en la etapa c) comparado con la presión durante la etapa b), en el que el agente estabilizante comprende un poliol formador de vidrio, seleccionado del grupo que consiste en glucosa, maltulosa, iso-maltulosa, lactulosa, sacarosa, maltosa, lactosa, sorbitol, iso-maltosa, maltitol, lactitol, palatinit, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melezitosa y dextrano, en el que la concentración del agente estabilizante usado está entre el 5 % y el 50 % en peso/volumen, en el que el líquido altamente viscoso tiene un contenido de disolvente menor de o igual al 15 % (p/p) y en el que el principio activo comprende una vacuna que comprende un virus.
 - 15
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la concentración de agente estabilizante es menos del 15 %.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el principio activo comprende VPI (virus de la polio inactivado).
- 20 4. Un líquido altamente viscoso que comprende un principio activo en el que se conserva la antigenicidad o actividad del principio activo, que se puede obtener por el procedimiento de las reivindicaciones 1-3, en el que el líquido altamente viscoso tiene un contenido de disolvente menor de o igual al 15 % (p/p) y en el que el principio activo comprende una vacuna que comprende un virus.
- 25 5. Una composición inmunogénica o vacuna que comprende el líquido altamente viscoso de la reivindicación 4 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
6. Un procedimiento de fabricación de una vacuna que comprende la etapa de reconstituir el líquido altamente viscoso de la reivindicación 4 en una solución acuosa.
- 30 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la solución acuosa comprende antígeno diftérico, antígeno tetánico y antígenos de *Pertusis* (acelular o células completas).
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la vacuna de DTP está al menos en parte acompañada de adyuvante con hidróxido de aluminio.
9. Un kit que comprende el líquido altamente viscoso de la reivindicación 4 mantenido en un primer recipiente y un componente de vacuna líquido en un segundo recipiente.
- 35

Figura 1

