

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 240**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2006 PCT/GB2006/050266**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2007 WO07026180**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2006 E 06779620 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 1928422**

54 Título: **Mejoras en la estabilización de materiales biológicos**

30 Prioridad:

31.08.2005 GB 0517688

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

26.02.2018

73 Titular/es:

**NOVA BIO-PHARMA TECHNOLOGIES LIMITED
(100.0%)**

**Martin House, Gloucester Crescent, Wigston
Leicester LE18 4YL, GB**

72 Inventor/es:

**ROSER, BRUCE y
MOSS, DAVID**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 656 240 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

Mejoras en la estabilización de materiales biológicos

La presente invención se refiere al uso de sustancias vítreas para estabilizar materiales biológicos.

5 Se sabe que ciertos materiales, en particular ciertos azúcares, son capaces de formar un vidrio, es decir, un sólido no cristalino que estabilizará el material biológico que vehiculiza, ya sea en suspensión o solución sólida. Son ejemplos de dichos materiales biológicos las vacunas y la insulina. A veces es necesario presentar el material biológico en forma líquida, por ejemplo, para la inyección en un paciente. Para este fin se ha propuesto formar el material vítreo en forma de partículas suspendidas en un líquido inerte no tóxico.

10 Un problema importante asociado a la propuesta anterior ha sido la selección de un líquido adecuado. Son vehículos líquidos tradicionales utilizados para la inyección de medicamentos los aceites que son menos densos que los vidrios de azúcar utilizados por lo general para la estabilización, provocando que este último se hunda hasta el fondo del líquido. Este sedimento puede llegar a ser muy compacto con el paso del tiempo. Aunque el recipiente podría volver a agitarse para volver a formar la suspensión antes de la administración, podría ser necesario que esta agitación sea muy vigorosa y prolongada para que sea eficaz. Existe un riesgo inaceptable de que dicha agitación no pueda realizarse correctamente, comprometiendo de este modo la eficacia del medicamento.

15 Más recientemente se ha propuesto el uso de perfluorocarbonos como el vehículo líquido. Los perfluorocarbonos tienen una alta densidad, lo que permite hacer coincidir la densidad de las partículas con la del líquido mediante la adición de un material más denso, tal como fosfato de calcio, en el vaso. Sin embargo, aunque se ha demostrado que esta técnica funciona bien y es adecuada a pequeña escala o con fines de emergencia, el uso de perfluorocarbonos en grandes cantidades debe realizarse con precaución, ya que podría tener un efecto no deseado sobre una parte superior de la atmósfera terrestre. Estos materiales son extremadamente estables incluso a altos flujos de luz ultravioleta y persisten en la estratosfera durante miles de años donde pueden constituir un peligro para el calentamiento global.

20 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento de fabricación de un producto vítreo para la estabilización de un material biológico que comprende las etapas de:

- 25 i) mezclar (a) un primer material líquido que comprende un material biológico y capaz de formar un vidrio en el que el primer material líquido comprende un ácido glutámico o sal del mismo, con (b) un segundo material que es un agente de soplado que experimenta descomposición y forma un gas cuando se calienta, en el que el segundo material comprende bicarbonato de amonio; y
- 30 ii) provocar que el primer material forme un vidrio al mismo tiempo que el segundo material forma el gas;

por el que una estructura vítrea en forma de partículas que contienen el gas se forma en un secador por pulverización.

35 Existe una variedad muy amplia de materiales vítreos que pueden utilizarse. Los materiales adecuados incluyen azúcares tales como rafinosa y trehalosa, Palatinit (una mezcla de glucopiranosil sorbitol y glucopiranosil manitol), glucopiranosil sorbitol, glucopiranosil manitol, lactitol y alcoholes de monosacáridos.

40 Un problema asociado al uso de vidrios de azúcar para estabilizar materiales biológicos es que es necesario eliminar casi toda el agua del vidrio para conseguir el efecto de estabilización deseado. Conseguir esto puede requerir condiciones (por ejemplo, una alta temperatura) que no son compatibles con las requeridas para conseguir el estado vítreo y para evitar dañar el material biológico activo. Se ha descubierto ahora que este problema puede resolverse mediante el uso de ácido glutámico o una sal del mismo tal como glutamato monosódico (en lo sucesivo en el presente documento denominado "MSG") como un componente en el material de formación de vidrio, en lugar de azúcares.

45 Anteriormente se ha reconocido que el MSG tiene propiedades de estabilización cuando se mezcla con otras sustancias formadoras de vidrio como se describe por ejemplo en la memoria descriptiva de patente US6872357 y en el trabajo "*Recoveries of bacteria after drying in Glutamate and other substances*" de D.I. Annear, publicado en el *Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.* (1964), 42, págs. 717-722. Sin embargo, los investigadores han descubierto que el MSG puede tener una humedad residual de más del 3 % y hasta de aproximadamente el 5 % y aun así no ablandarse sustancialmente por la misma y conservar sus propiedades estabilizadoras hasta aproximadamente 70 °C. Además, mientras entra en el estado vítreo, los investigadores han descubierto que el MSG tiene un estado de transición pronunciado en el que está en forma de un semisólido viscoso similar al jarabe. Esto hace que sea especialmente eficaz para atrapar burbujas de gas medida que se forman.

50 Se ha descubierto que, cuando se usa ácido glutámico o una sal tal como MSG, el material activo (en particular si incluye un adyuvante en forma de micropartículas) puede provocar que se produzca la cristalización. Esta dificultad puede superarse mediante la inclusión de un inhibidor de la cristalización tal como ácido aspártico o una sal del mismo. Este inhibidor de la cristalización es preferentemente a su vez un formador de vidrio tal como aspartato monosódico (MSA) y los dos componentes están presentes preferentemente en relaciones molares similares (entre

4:6 y 6:4) para proporcionar la inhibición óptima de la cristalización.

Durante el procedimiento de secado de una solución de material formador de vidrio por calor, especialmente si el secado se realiza en gotitas de material, se evita que la temperatura de las gotitas se eleve por una rápida velocidad de evaporación de la superficie de la gotita con su enfriamiento por evaporación asociado. A medida que la solución se vuelve más viscosa la movilidad de las moléculas de agua hacia la superficie de la gotita se ralentiza por la viscosidad creciente y la temperatura de la gotita aumenta a medida que se reduce el enfriamiento por evaporación. Por tanto, la temperatura de la gotita de jarabe que se seca aumenta rápidamente a medida que comienza a solidificarse en forma de un vidrio.

El gas se introduce en el vidrio mediante la mezcla del material formador de vidrio (y el material biológico) con un producto químico que se descompone en las condiciones apropiadas para formar el gas. De acuerdo con la presente invención, el producto químico es bicarbonato de amonio que se elige de manera que el gas se libere cuando la temperatura haya subido a un nivel en el que el material formador de vidrio esté en un estado de transición viscoso entre líquido y sólido. Se ha identificado al bicarbonato de amonio como un aditivo adecuado porque éste se descompone en amoníaco gaseoso, dióxido de carbono y vapor de agua a aproximadamente la misma temperatura que el aumento de la viscosidad, es decir aproximadamente a 60 °C.

El uso de MSG es, por tanto, particularmente apropiado porque el subproducto agua no afecta negativamente a sus propiedades estabilizadoras. Puede ser posible; sin embargo, usar otros materiales formadores de vidrio tales como azúcares, incluyendo rafinosa y trehalosa. El uso de fosfato de calcio es de particular interés debido a su fuerza física. Se conjetura que un componente sólido en forma de panal producido de esta manera se podría moldear de manera que forme una parte estructural, especialmente si se forma con una superficie exterior continua. Tendría una gran resistencia y un peso ligero similares a las características de los huesos de animales. Posiblemente una sustancia de este tipo podría usarse con fines de reparación o sustitución ósea.

A modo de ejemplo se describirán ahora ejemplos de cómo se ha implementado la invención con referencia a las ilustraciones adjuntas en las que:

La Fig. 1 es una imagen producida mediante un microscopio electrónico de barrido, de partículas vítreas de MSG producidas mediante un procedimiento de acuerdo con la invención;

La Fig. 2 es un dibujo muy esquemático que muestra las partículas de la Fig. 1 suspendidas en un líquido biocompatible no tóxico no acuoso para formar una suspensión estable adecuada para la inyección a través de una jeringa hipodérmica; y

La Fig. 3 muestra los resultados de experimentos que demuestran cómo la densidad de las partículas varía con concentraciones variables de bicarbonato de amonio para temperaturas de entrada y caudales diferentes del secador por pulverización.

La primera etapa es fabricar una solución acuosa que contenga un agente formador de vidrio y un agente formador de gas (en lo sucesivo en el presente documento denominado un "agente de soplado"). En este ejemplo el agente formador de vidrio es MSG y el agente de soplado es bicarbonato de amonio. El MSG está a una concentración de 200 mg/ml y el bicarbonato de amonio a una concentración de 17,4 mg/ml. Después se añade un material biológico a la solución. Esto no afecta significativamente a las concentraciones mencionadas anteriormente.

Un mini secador por pulverización Buchi B290 se ajusta de manera que el gas entre en su cámara de secado a una temperatura de gas de entrada de 150 °C y sale a aproximadamente 95 °C. El caudal de gas de secado se ajusta a un valor nominal de 600 litros/hora en la cámara de secado.

La solución acuosa se introduce en la cámara de secado en forma de una pulverización fina a través de una boquilla de 0,7 mm. Durante un periodo de entre 1 y 1,5 segundos esto se seca para formar un polvo que después se recoge. El polvo se separa del gas de secado en un ciclón unido al escape de la cámara de secado y cae por gravedad en una botella unida a la parte inferior del ciclón. Durante este periodo la temperatura de las partículas aumenta desde la temperatura ambiente (aproximadamente 21 °C) a un máximo teórico de 95 a 120 °C (la temperatura de salida). En la práctica real la temperatura de las partículas de vidrio secas no se detiene durante un periodo prolongado a la temperatura de salida ya que se separan de los gases de escape calientes en el ciclón en unos pocos segundos y se recogen juntas en la botella de recogida más fría.

A medida que las partículas pasan a través de la cámara de secado, su temperatura aumenta inicialmente de forma relativamente lenta porque el calor absorbido por las partículas se usa en la evaporación del disolvente (agua). Las partículas después forman un vidrio mediante la evaporación del disolvente, pasando por una etapa intermedia en la que no son ni líquidas ni de vidrio. En las condiciones del procedimiento que se ha descrito anteriormente las partículas están a aproximadamente 60 cuando entran en esta etapa intermedia. El calentamiento continuado elimina la mayor parte del agua restante de manera que la composición continúa endureciéndose a través de la evaporación del disolvente y pronto forma un vidrio.

El bicarbonato de amonio se descompone cuando se expone al calor, comenzando a 36 °C y descomponiéndose

completamente a 60 °C. Los productos de la descomposición son un 21,5 % de amoníaco, un 5,7 % de dióxido de carbono y un 22,8 % vapor de agua (datos del Índice Merck). Por tanto, entre aproximadamente 60 °C y 70 °C, justo cuando las partículas están en su estado intermedio entre líquido y vidrio, el bicarbonato de amonio se descompone rápidamente en amoníaco, dióxido de carbono y vapor de agua. En este momento, el MSG es blando y flexible. Es semisólido como el jarabe espeso. Por tanto, quedan atrapadas burbujas de gas dentro de las gotitas de MSG a medida que entran en un estado vítreo.

El contenido de humedad típico del producto final secado por pulverización fabricado mediante el procedimiento que se ha descrito anteriormente es de aproximadamente el 4 % en peso, medido mediante el procedimiento de coulombimetría de Karl Fischer. Las partículas tienen una densidad media de 0,94 (en comparación con el MSG solo que tiene una densidad de 1,46). Las densidades de polvo pueden medirse por picnometría usando desplazamiento de helio.

Por último, el polvo seco, que contiene el material biológico estabilizado por el efecto del MSG vítreo, se suspende en una mezcla no acuosa de triglicéridos de cadena media compuesta de aproximadamente el 60 % de ácido caprílico (C8, octanoílo) y el 40 % de ácido cáprico (C10, decanoílo). Esta mezcla se comercializa con el nombre comercial de "Crodamol GTCC") y es un líquido biocompatible anhidro no tóxico que tiene una densidad aproximadamente igual a las esferas secadas por pulverización. La densidad del Crodamol GTCC es suficientemente cercana a la de cada una de las esferas, para que tenga el efecto de que una vez suspendidas en el líquido, las esferas permanezcan todas en suspensión a temperaturas normales. La suspensión es tan física y biológicamente estable que puede usarse en un inyector precargado y almacenarse y transportarse sin refrigeración. Debido al efecto de estabilización química del MSG, el ingrediente activo no se deteriora y, debido al efecto sobre la densidad de los huecos de gas en las partículas, estas últimas permanecen indefinidamente en suspensión. Se apreciará que, cuando la suspensión se ha inyectado en un cuerpo humano o animal, las partículas de vidrio, que son hidrosolubles, se disuelven en el fluido corporal, liberando de este modo el ingrediente activo.

La Fig. 1 muestra una imagen, producida usando un microscopio electrónico de barrido, de partículas secadas por pulverización fabricadas de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. Para inspeccionar la estructura interior de las esferas, se mezclaron con un vehículo líquido que después se congeló y se rompió de acuerdo con una práctica de "congelación-fractura" convencional utilizada en microscopía. La superficie rota del vehículo congelado forma el fondo de la imagen. Puede observarse que las partículas son aproximadamente esféricas y varían en diámetro de aproximadamente 14 µm a aproximadamente 15 µm, suficientemente pequeñas para que las partículas suspendidas pasen a través de la aguja de una jeringa hipodérmica. El tamaño de las partículas indicado anteriormente debe compararse con un tamaño medio de partícula de aproximadamente 3-5 µm que se produce usando un procedimiento similar, pero sin el bicarbonato de amonio.

En la Fig. 1, una de las esferas más grandes está rota, revelando que es completamente hueca y tiene un espesor de pared de aproximadamente 1 µm. Es posible que las esferas más pequeñas puedan tener una estructura similar o una estructura más compleja como se ilustra en la Fig. 2.

Con referencia a la Fig. 2, el líquido Crodamol GTCC se indica como 1 y tiene, suspendidas en él, las partículas de vidrio 2 que tienen una densidad media igual a la del líquido. La partícula 2A, que se muestra rota para revelar su interior, se estructura como la que se muestra en la Fig. 1. La partícula 2B, que también se muestra rota, contiene un gran número de huecos gaseosos, formando una estructura similar a una esponja o panel de abejas; aunque la partícula 2C tiene una estructura intermedia de los extremos de 2A y 2B, teniendo solo unos pocos huecos. Las densidades de estas estructuras diferentes serán ligeramente diferentes pero todas ellas están en un intervalo que permite procesos termodinámicos a temperaturas normales para mantener las partículas en suspensión permanente.

En un procedimiento alternativo de acuerdo con la invención, en lugar de emplear MSG puro, una mezcla de una solución molar igual (0,5 M) de MSG y MSA se forma mediante la adición de 0,935 g de MSG y 0,865 g de MSA (1,8 g en total) a 10 ml de agua destilada. Los materiales adecuados incluyen monohidrato de L-glutamato monosódico y monohidrato de L-aspartato de monosódico de Ajinomoto.

La solución resultante se añade a un material de vacuna que comprende 2 mg de un antígeno de hepatitis B con 160 mg de adyuvante de hidróxido de aluminio con el fin de proporcionar una relación de estabilizador total (es decir, en este caso MSA y MSG) con respecto al adyuvante de 10,7:1 (1,8 g:0,16 g). Se añade una cantidad de bicarbonato de amonio en el intervalo que se muestra en la Fig. 3.

Después se usa un mini secador por pulverización Buchi B290 como se ha descrito anteriormente para formar un polvo de baja densidad.

Como, en cualquiera de los procedimientos descritos, el vidrio se forma a partir de formadores de vidrio hidrosolubles, el polvo resultante puede rehidratarse cuando sea necesario con la cantidad requerida de agua estéril.

Se apreciará que los procedimientos descritos anteriormente son solo ejemplos de cómo puede usarse la invención. La densidad de las partículas puede controlarse con precisión, mediante la adición de una cantidad seleccionada de bicarbonato de amonio, de manera que su densidad coincida con la de cualquier líquido alternativo en el que hayan

5 de suspenderse. Los experimentos han demostrado que es posible incorporar hasta 1,0 M (79 mg/ml) de bicarbonato de amonio, produciendo esa última concentración esferas secas con un diámetro medio de aproximadamente 20 μm y una densidad de 0,64. Otros estudios, cuyos resultados se muestran en la Fig. 3, han demostrado que el efecto de variar la concentración de bicarbonato de amonio, variar el caudal del líquido que entra en el secador por pulverización y variar la temperatura del gas de entrada del secador por pulverización es controlar estrechamente la densidad de las microesferas producidas.

10 También se observa que, aunque en el ejemplo particular descrito el gas se libera mientras que el vidrio se está formando mediante la evaporación del disolvente, puede conseguirse un efecto similar mediante el uso de vidrios cuya temperatura de transición se haga coincidir con la temperatura de la sustancia formadora de gas (el agente de soplado). En una variación de este tipo, el vidrio, mezclado con el agente de soplado se calentaría de manera que se ablande, punto en el que el gas se liberaría para formar los huecos necesarios. El enfriamiento posterior completaría el procedimiento.

15 Las técnicas descritas anteriormente proporcionan una forma prometedora de ajustar la densidad de las partículas de manera que coincida con la densidad de un líquido en el que se suspenden posteriormente. Sin embargo, se ha observado que las partículas producidas de acuerdo con la invención pueden tener una densidad tan baja que se suspendan fácilmente en un medio gaseoso y que, por tanto, la invención tiene una aplicación potencial en medicamentos destinados a la inhalación. También se ha observado que las partículas, debido a su gran área superficial (incluyendo áreas expuestas a los huecos internos), tienen la capacidad de disolverse rápidamente en líquidos acuosos y, por tanto, pueden ser valiosas en situaciones en las que se desea almacenar materiales
20 biológicos estabilizados en forma sólida y estable y disolverlos poco antes de su uso.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de fabricación de un producto vítreo para la estabilización de un material biológico que comprende las etapas de:
- 5 i) mezclar (a) un primer material líquido que comprende un material biológico y capaz de formar un vidrio, en el que el primer material líquido comprende un ácido glutámico o sal del mismo, con (b) un segundo material que es un agente de soplado que experimenta descomposición y forma un gas cuando se calienta, en el que el segundo material comprende bicarbonato de amonio; y
- ii) provocar que el primer material forme un vidrio al mismo tiempo que el segundo material forma el gas;
- 10 en el que una estructura vítrea en forma de partículas que contienen el gas se forma en un secador por pulverización.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el vidrio incluye glutamato monosódico.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el vidrio incluye fosfato de calcio.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente la etapa de formar la estructura vítrea en forma de partículas que contienen el gas.
- 15 5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende adicionalmente la etapa de formar la estructura vítrea en forma de un cuerpo estructural.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende la etapa adicional de suspender las partículas en un líquido no tóxico.

Fig 1

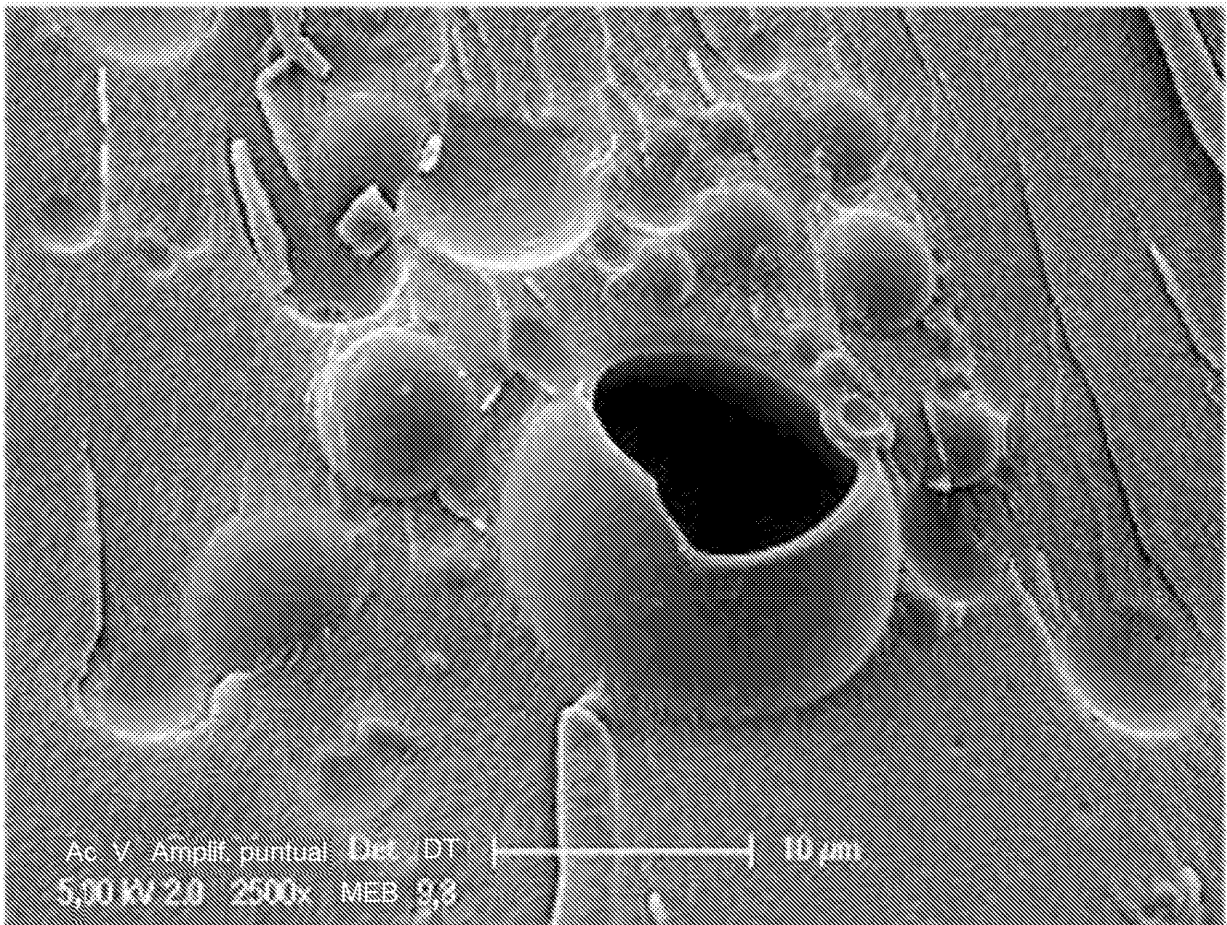


Fig 2

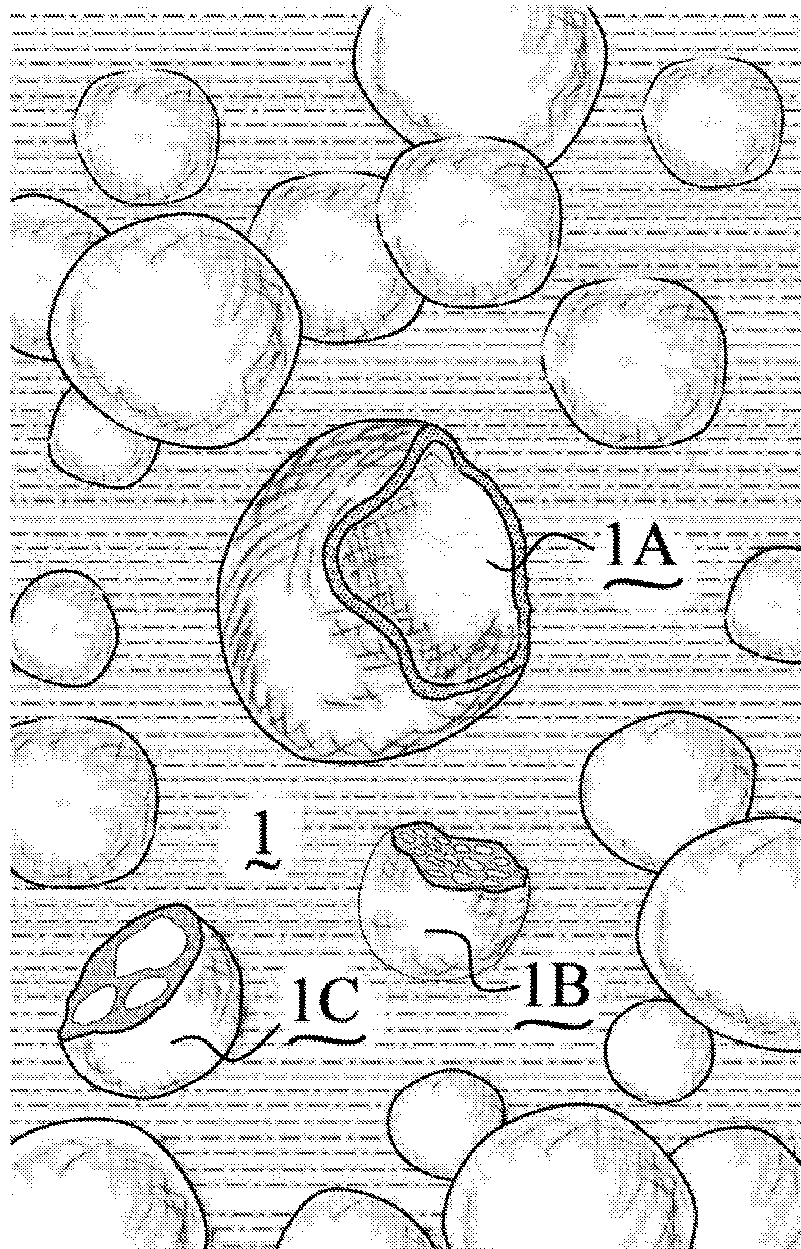


Fig 3

