

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 169**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17	(2006.01)
A61K 9/19	(2006.01)
A61K 38/42	(2006.01)
A61K 47/22	(2006.01)
A61K 47/26	(2006.01)
A61K 35/62	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2013 PCT/FR2013/051271**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13182806**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2013 E 13730039 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2854835**

54 Título: **Procedimiento de liofilización de hemoglobina de anélidos**

30 Prioridad:

05.06.2012 FR 1255204

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

04.09.2018

73 Titular/es:

**HEMARINA (100.0%)
Aeropole Centre
29600 Morlaix, FR**

72 Inventor/es:

**ZAL, FRANCK y
ROUSSELOT, MORGANE**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 680 169 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 liofilización de hemoglobina de anélidos

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento de liofilización de al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de anélidos, así como al liofilizado obtenido.
- [0002]** La hemoglobina extracelular de anélidos es útil como sustituto de la sangre y permite tratar problemas relacionados con la falta de oxígeno.
- 10 Por sustituto sanguíneo, se entiende cualquier producto o solución que permite compensar una pérdida de sangre después de una hemorragia al aportar transportadores de oxígeno. Un sustituto sanguíneo es diferente de una sangre artificial ya que el sustituto sanguíneo no puede cumplir con todas las funciones realizadas por la sangre, tales como el transporte de hormonas, por ejemplo.
- 15 **[0003]** Actualmente, ya se conocen dos clases farmacéuticas de productos de sustitución: se trata de perfluorocarbonos (PFC) y de "*Hemoglobin Oxygen Carrier* (HBOC)", o transportadores de oxígeno a base de hemoglobina. Los PFC son compuestos sintetizados químicamente que permiten el transporte de O₂ en forma disuelta en el
- 20 torrente sanguíneo y en los tejidos. Los HBOC provienen de la purificación y acto seguido de la modificación química de Hb bovina o humana (estas últimas provienen de bolsas de sangre caducadas) o aún son resultado de la síntesis por ingeniería genética.
- [0004]** Con el fin de almacenar los HBOC, un procedimiento convencional consiste en acondicionar las
- 25 moléculas de hemoglobina en solución. A fin de garantizar una mejor estabilidad, en algunos casos, es necesario conservarlas a una temperatura entre -20 °C y -80 °C antes de su uso. Su transporte se lleva a cabo en hielo seco para garantizar la ausencia de descongelación. Estas diferentes condiciones implican un costo adicional y una logística de almacenamiento y de transporte más restrictiva que pueden resultar limitantes para ciertas aplicaciones.
- 30 **[0005]** El documento WO2010/128159 describe la hemoglobina de *Nereididae*, el documento WO2007/035583 describe la liofilización de hemoglobina de vertebrados y el documento WO03/026786 describe un procedimiento de liofilización que utiliza un compuesto que disminuye el contenido de disolvente residual.
- [0006]** Por lo tanto, existe la necesidad de disponer de una hemoglobina funcional que se pueda almacenar y
- 35 transportar con facilidad, incluso en entornos remotos sin refrigeración.
- [0007]** Existen soluciones, y una de ellas es la liofilización.
- [0008]** Sin embargo, estudios preliminares han revelado que las moléculas de hemoglobina se degradan
- 40 parcialmente por el proceso de liofilización, lo que altera en particular su funcionalidad, es decir, su capacidad para fijar de forma reversible el oxígeno. Esto se describe además en la literatura para las proteínas de manera general (HELLER.Martin.C, CARPENTER.John.F, RANDOLPH.Theodore.W, "Protein Formulation and Lyophilization Cycle Desing: Prevention Damage due to Freeze-Concentration Induced Phase Separation" *Biotechnology and Bioengineering*, Vol 63, n.º 2, 1999.).
- 45 **[0009]** Los inventores han descubierto ahora que, sorprendentemente, la hemoglobina extracelular de anélidos, cuando se mezcla con un agente estabilizante específico, puede liofilizarse, al tiempo que conserva su estructura cuaternaria, su funcionalidad y su eficacia.
- 50 **[0010]** La presente invención se refiere así a un procedimiento de liofilización de al menos una hemoglobina extracelular de anélidos. La presente invención también se refiere al liofilizado así obtenido. Este último permite de hecho almacenar la hemoglobina extracelular de anélidos, en un formato económico, práctico (es decir, requiere un mínimo de espacio), conservando las propiedades estructurales y funcionales de la hemoglobina.
- 55 **[0011]** El liofilizado según la invención comprende al menos una hemoglobina extracelular de la familia de *Arenicolidae* o de la familia de *Nereididae*, y un agente estabilizante seleccionado entre disacáridos.
- [0012]** Asimismo se describe una composición que comprende:

- una solución que comprende al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de anélidos, y
- un agente estabilizante seleccionado entre disacáridos, polioles y antioxidantes, seleccionados preferentemente entre trehalosa y ácido ascórbico.

5

[0013] La hemoglobina extracelular de anélidos está presente en las tres clases de anélidos: poliquetos, oligoquetos y aquetos. Se habla de hemoglobina extracelular puesto que está naturalmente no contenida en una célula, y por lo tanto puede circular libremente en el sistema sanguíneo sin modificación química para estabilizarla o hacerla funcional.

10

La hemoglobina extracelular de anélidos es un biopolímero gigante de peso molecular comprendido entre 2.000 y 4.000 kDa, constituido de aproximadamente 200 cadenas polipeptídicas comprendidas entre 4 y 12 tipos diferentes que generalmente se agrupan en dos categorías.

15 La primera categoría, que comprende 144 a 192 elementos, agrupa las llamadas cadenas polipeptídicas "funcionales" que llevan un sitio activo de tipo hemo y son capaces de unirse de forma reversible al oxígeno; son cadenas de tipo globina cuyas masas están comprendidas entre 15 y 18 kDa y que son muy similares a las cadenas de tipo α y β de los vertebrados.

20 La segunda categoría, que cuenta de 36 a 42 elementos, agrupa las llamadas cadenas polipeptídicas de "estructura" o "enlazadores" que poseen un sitio activo escaso o nulo pero que permiten el ensamblaje de subunidades denominadas doceavas o protómeras. Cada molécula de hemoglobina está constituida de dos hexágonos superpuestos que se denominan bicapa hexagonal (*hexagonal layer*) y cada hexágono está formado por el ensamblaje de seis subunidades (o "doceavas" o "protómeras") en forma de una gota de agua. La molécula nativa está formada de doce de estas subunidades (dodecámero o protómero). Cada subunidad tiene una masa molecular comprendida entre 200 y 250 kDa, y constituye la unidad funcional de la molécula nativa.

25 **[0014]** Preferentemente, la hemoglobina extracelular de anélidos se selecciona entre las hemoglobinas extracelulares de anélidos poliquetos, preferentemente entre las hemoglobinas extracelulares de la familia *Arenicolidae* y las hemoglobinas extracelulares de la familia *Nereididae*. Incluso más preferentemente, la hemoglobina extracelular de anélidos se selecciona entre la hemoglobina extracelular de *Arenicola marina* y la hemoglobina extracelular de *Nereis*, más preferentemente la hemoglobina extracelular de *Arenicola marina*.

30 **[0015]** Se describe también un liofilizado o una composición que comprende al menos un protómero de globina de la hemoglobina extracelular de anélidos. Dicho protómero constituye la unidad funcional de la hemoglobina nativa, como se ha indicado anteriormente. Finalmente, también se describe un liofilizado o una composición que comprende al menos una cadena de globina de la hemoglobina extracelular de anélidos. Dicha cadena de globina puede seleccionarse en particular entre las cadenas de globina de tipo Ax y/o Bx de la hemoglobina extracelular de anélidos.

40

45 **[0016]** La hemoglobina extracelular de anélidos y sus protómeros de globina tienen una actividad superóxido dismutasa (SOD) intrínseca, y la presencia de antioxidante no es necesaria para su funcionamiento, a diferencia del uso de la hemoglobina de mamíferos, para la cual las moléculas antioxidantes están contenidas en el interior del glóbulo rojo y no están unidas a la hemoglobina. Por otra parte, la hemoglobina extracelular de anélidos, sus protómeros de globina y/o sus globinas no requieren un cofactor para funcionar, a diferencia de la hemoglobina de mamífero, especialmente humana. Finalmente, la hemoglobina extracelular de anélidos, sus protómeros de globina y/o sus globinas que no poseen tipificación sanguínea, permiten evitar cualquier problema de reacción inmunológica.

50 **[0017]** La hemoglobina extracelular de anélidos, sus protómeros de globina y/o sus globinas pueden ser nativos o recombinantes.

[0018] La composición descrita también comprende una solución. Esta solución es capaz de crear un entorno salino adecuado para la hemoglobina, sus protómeros y sus globinas, y permite así el mantenimiento de la estructura cuaternaria y, por lo tanto, la funcionalidad de esta molécula. Gracias a la solución, la hemoglobina, sus

55 protómeros y sus globinas son capaces de asegurar su función de oxigenación. La solución es una solución acuosa que comprende sales, preferentemente iones cloruro, sodio, calcio, magnesio y potasio, y confiere a la composición un pH comprendido entre 6,5 y 7,8; su formulación es similar a la de un líquido fisiológicamente inyectable. En estas condiciones, la hemoglobina extracelular de anélidos, sus protómeros de globina y sus globinas permanecen funcionales.

En la presente descripción, se entiende que el pH está a temperatura ambiente (20 ± 5 °C), a menos que se especifique lo contrario.

[0019] Preferentemente, la solución es una solución acuosa que comprende cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, así como sodio gluconato y sodio acetato, y tiene un pH comprendido entre 6,5 y 7,8, preferentemente igual a $7,1 \pm 0,5$, preferentemente aproximadamente 7,35. Más preferentemente, la solución de estabilización es una solución acuosa que comprende NaCl 0-100 mM, preferentemente NaCl 90 mM, Na-gluconato 23 mM, CaCl_2 2,5 mM, Na-acetato 27 mM, MgCl_2 1,5 mM, KCl 5 mM, y tiene un pH de $7,1 \pm 0,5$, que puede contener entre 0 y 100 mM de antioxidante de tipo ácido ascórbico y/o glutatión reducido. Dicha solución tiene preferentemente una osmolaridad comprendida entre 300 y 450, preferentemente entre 300 y 350, y preferentemente de 302 mOsmol/l.

[0020] La composición descrita y el liofilizado según la invención también comprenden un agente estabilizante. Este agente estabilizante asegura el mantenimiento de la estructura cuaternaria y, por lo tanto, la funcionalidad de la hemoglobina, sus globinas y sus protómeros, incluso después de la liofilización.

Por "agente estabilizante" se entiende un disacárido, un poliol y/o un antioxidante. Los disacáridos comprenden especialmente sacarosa, trehalosa y rafinosa, preferentemente trehalosa. La eficacia del agente estabilizante se determina comparando la fisicoquímica y las propiedades funcionales de la hemoglobina antes y después de la liofilización.

El agente estabilizante según la invención se selecciona entre disacáridos.

[0021] Preferentemente, los disacáridos se seleccionan entre trehalosa y sacarosa. Más preferentemente, el disacárido es trehalosa. Preferentemente, los polioles se seleccionan entre manitol y sorbitol. Finalmente, preferentemente, el antioxidante es ácido ascórbico.

La trehalosa también se llama α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido o alfa,alfa-trehalosa o α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido, dihidrato. Es un disacárido compuesto por dos moléculas de glucosa unidas entre sí por un enlace α,α -1,1 (o "1,1- α -glicosídico") particularmente estable.

La sacarosa (también llamada "sucrosa" en la presente solicitud) es un disacárido formado por la condensación de una molécula de glucosa con una molécula de fructosa. Su nombre químico es β -D-fructofuranosil-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-glucopiranosido.

El manitol, o 1, 2,3,4,5,6-hexanhexol y sorbitol, o (2R,3S,4S,5S)-hexano-1,2,3,4,5, 6-hexol, son polioles.

Finalmente, el ácido ascórbico es un ácido orgánico con propiedades antioxidantes. Puede estar presente en forma D o L. Preferentemente, el agente estabilizante es ácido L-ascórbico o vitamina C.

Preferentemente, el agente estabilizante es trehalosa. Preferentemente, la composición y/o el liofilizado según la invención comprenden trehalosa y ácido ascórbico.

[0022] La composición descrita y el liofilizado según la invención pueden comprender sales. Estas sales pueden seleccionarse entre sales de sodio, calcio, magnesio y potasio. Preferentemente, las sales se seleccionan entre cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, sodio gluconato y sodio acetato.

[0023] La invención también tiene por objeto un procedimiento de preparación de un liofilizado, que se describe en la reivindicación 5.

[0024] Asimismo se describe un procedimiento de preparación de un liofilizado, que comprende:

- i) la mezcla de una solución que comprende al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de anélidos con un agente estabilizante seleccionado entre disacáridos, polioles y antioxidantes,
- ii) la congelación de la mezcla obtenida en i) a una temperatura comprendida entre -10 °C y -100 °C, preferentemente entre -20 °C y -100 °C durante un tiempo de al menos 24 h, preferentemente al menos 48 h;
- iii) la sublimación de la mezcla congelada obtenida en ii) durante al menos 2 h al vacío;
- iv) el secado final de la mezcla obtenida en iii) hasta que se obtiene un polvo.

[0025] La mezcla de la etapa i) se realiza en particular por vórtex.

Preferentemente, el agente estabilizante, en particular el disacárido o el poliol, está presente en la mezcla de la etapa i) del procedimiento según la invención en una concentración comprendida entre 1 y 500 mg/ml. Alternativamente, el agente estabilizante, especialmente antioxidante, está presente en la mezcla de la etapa i) en una concentración comprendida entre 3 y 20 mM. Aún más preferentemente, el agente estabilizante presente en la mezcla de la etapa i) se selecciona entre:

- trehalosa y sacarosa, presentes en una concentración comprendida entre 50 y 70 mg/ml, preferentemente de manera aproximada 55 mg/ml o 65 mg/ml,
- trehalosa y sacarosa, presentes en una concentración de aproximadamente 100 mg/ml,
- 5 - manitol presente en una concentración comprendida entre 50 y 100 g/l, y
- ácido ascórbico presente en una concentración de aproximadamente 5 mM.

La solución obtenida al final de la etapa i) comprende, por lo tanto, al menos una globina, un protómero de globina o una hemoglobina extracelular de anélidos, y el agente estabilizante.

10

[0026] Esta solución está sometida a liofilización. El ciclo de liofilización puede comprender tres etapas:

- la congelación (etapa ii) del procedimiento según la invención):

15 Esta primera fase consiste en congelar la solución de tal manera que el agua contenida se convierta en hielo.

Preferentemente, la congelación de la etapa ii) del procedimiento según la invención se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre -10 °C y -100 °C, preferentemente entre -20 °C y -90 °C durante al menos 24 h, preferentemente al menos 48 h. Preferentemente, la congelación se lleva a cabo a aproximadamente -20 °C durante

20

- el secado primario o sublimación (etapa iii) del procedimiento según la invención):

La etapa de sublimación permite que el hielo presente en la solución congelada pase del estado sólido al estado gaseoso, sin etapa intermedia. La solución congelada está seca debido al vacío; el hielo se convierte así pues en vapor.

25

La sublimación se realiza utilizando una bomba de alto vacío, una bomba mecánica o una criobomba. Preferentemente, la sublimación de la etapa iii) se lleva a cabo durante al menos 4 h.

30

- el secado secundario o secado final (etapa iv) del procedimiento según la invención):

Cuando el hielo se sublima por completo, puede comenzar la fase de secado secundario. Permite extraer por desorción las moléculas de agua atrapadas en la superficie de los productos secos.

35

[0027] Al final de la liofilización, y por lo tanto del procedimiento, el liofilizado obtenido comprende entre 0,1 y 5 % en peso de agua. El liofilizado es un polvo, que se vuelve a disolver completamente en un líquido hidrófilo, sin residuos insolubles. El polvo puede almacenarse en botellas o frascos de vidrio o plástico, preferentemente vidrio.

40

[0028] La hemoglobina liofilizada así obtenida es fácil de transportar y almacenar. El liofilizado según la presente invención es de este modo fácil de reconstituir y está listo para ser usado.

45

[0029] Asimismo se describe una composición que comprende el liofilizado según la invención, y un diluyente. El liofilizado puede de hecho diluirse en el momento apropiado con un diluyente, con el fin de restituir la solución de hemoglobina inicial. Preferentemente, el diluyente es agua ultrapura, a fin de no modificar la concentración de las sales de la solución, y obtener una composición que tiene un volumen equivalente al de antes de la liofilización.

50

[0030] La invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos, y no son limitativos.

Ejemplo 1

Material y procedimientos

55

El protocolo del estudio

[0031] Los inventores evaluaron los efectos de la liofilización y el impacto de los excipientes añadidos sobre la formulación en:

- la estructura cuaternaria de las hemoglobinas,
- la funcionalidad: capacidad de fijar oxígeno,
- la efectividad de las hemoglobinas en modelos celulares.

5

La preparación de hemoglobinas (Hb)

[0032] Para el conjunto de estudios, se utilizó el mismo lote de Hb. Una cantidad calculada de Hb se descongela a 5 ± 3 °C durante 1 hora. Una vez descongelado, se añade la cantidad necesaria de excipiente en forma líquida para alcanzar la concentración deseada.

[0033] La solución así obtenida se congela a -80 °C durante al menos 24 h. La solución congelada se liofiliza a continuación en el liofilizador durante aproximadamente 4 h hasta que se obtiene un polvo. Este polvo se almacena luego a -80 °C antes del estudio de estabilidad.

15

[0034] La reconstitución se lleva a cabo con agua ultrapura para no modificar la concentración de sales y en un volumen equivalente al de antes de la liofilización.

Las herramientas analíticas

20

[0035] El estudio de seguimiento del producto consta de tres fases: el seguimiento de la estructura de la molécula, el seguimiento de su funcionalidad y, finalmente, el seguimiento de la concentración de hemoglobina.

El seguimiento de la estructura

25

[0036] La estructura es seguida por un procedimiento de cromatografía específica de proteínas: la FPLC, (*Fast Protein Liquid Chromatography*: cromatografía líquida rápida de proteínas). Utiliza el principio de exclusión estérica. El sistema utilizado es comercializado por Dionex® bajo el nombre comercial Ultimate 3000. Está completamente automatizado y controlado por el software complementario Chromeleon®.

30

[0037] Las columnas utilizadas son comercializadas por GE Healthcare® y son del tipo Superose 6, 10 x 300 mm; permiten una separación de las moléculas cuyo peso molecular está comprendido entre 5 MDa y 5.000 Da en una hora a un caudal de 0,5 ml/min. La separación se lleva a cabo en condición isocrática, es decir, que solo hay un tampón de elución.

35

[0038] La adquisición en el contexto del estudio de la hemoglobina se efectúa a 2 longitudes de onda (280 nm y 414 nm). Con el fin de detectar la molécula diana, la hemoglobina, la densidad óptica se mide a 280 nm (pico de absorción de proteínas) y a 414 nm (pico de absorción de hemo). La adquisición a 414 nm permite identificar la hemoglobina entre las otras proteínas observadas a 280 nm. A esta misma longitud de onda, también es posible seguir la cinética de disociación de la hemoglobina. El software Chromeleon® suministrado con el equipo, permite a la vez recopilar los datos pero también procesarlos.

40

[0039] El tratamiento de datos se realiza por análisis de los cromatogramas obtenidos a 280 nm y a 414 nm.

45 **[0040]**

El software permite integrar los cromatogramas:

- El área bajo la curva del pico de interés es proporcional a la concentración;
- El porcentaje relativo de pureza de cada pico calculado por el software permite seguir la evolución de la degradación de la molécula con el tiempo.

50

[0041] En el caso del estudio, se realizan cinéticas que permiten cuantificar los efectos de los excipientes seleccionados y el comportamiento de la molécula durante una semana. Para este fin, los cromatogramas de cada excipiente se integran en cada punto (tiempo T_0 hasta el día 5) y los datos generados por el software (el área bajo la curva y el porcentaje relativo de pureza) se procesan gráficamente utilizando software Graphpad® para determinar la cinética de degradación y compararlos.

55

El seguimiento de la funcionalidad

[0042] La funcionalidad de la molécula de hemoglobina se define por su capacidad para fijar de forma

reversible el oxígeno. Este estudio es posible con espectrofotometría UV-visible.

[0043] La hemoglobina posee una firma espectrofotométrica característica que evoluciona en función de su funcionalidad y su estado de oxidación. La medición se lleva a cabo en una ventana de longitudes de onda comprendida entre 250 y 700 nm. Por lo tanto, se obtienen espectros de absorción diferentes según el estado de oxidación.

[0044] Por ejemplo, la hemoglobina de *Arenicola marina* (HbAm) presenta en su estado oxigenado dos picos en el visible, es decir, las bandas alfa y beta, respectivamente, presentes a 576 nm y 540 nm, y una llamada banda de Soret a 414 nm. Las primeras citadas son características de la absorción del complejo formado entre el núcleo del hemo, el hierro y el oxígeno. La banda de Soret es sinónimo, a su vez, de la absorción del complejo formado entre la cadena polipeptídica y el núcleo de hemo.

[0045] La hemoglobina posee propiedades espectrales características de sus cambios conformacionales entre los estados oxigenados y no oxigenados.

[0046] Por lo tanto, en función de los máximos registrados, los diferentes estados de hemoglobina se pueden determinar al notificarlos en la siguiente tabla:

Banda de Soret	Banda alfa	Banda beta	Forma de la hemoglobina
414 ± 2 nm	540 ± 2 nm	576 ± 2 nm	Oxihemoglobina
430 ± 2 nm	555 ± 2 nm	555 ± 2 nm	Desoxihemoglobina
418 ± 2 nm	535 ± 2 nm	570 ± 2 nm	Carboxihemoglobina
406 ± 2 nm	500 ± 2 nm	630 ± 2 nm	Metemoglobina

[0047] Finalmente, se puede determinar el porcentaje de hemoglobina oxidada. Los espectros UV-visible adquiridos entre 250 y 700 nm se normalizan a 523 nm (punto isobéptico). Las absorbancias a 576 nm (banda alfa) y 540 nm (banda beta) se añaden para cada espectro. De forma similar, se registran las absorbancias para una muestra de referencia e idealmente no presentan oxidación (en el caso de la liofilización = el D0 de una muestra no liofilizada se selecciona como referencia). Luego se realiza la misma operación para una muestra considerada como 100 % oxidada (obtenida por incubación a 37 °C hasta la desaparición de las bandas alfa y beta). El porcentaje de oxidación de la molécula se obtiene mediante el siguiente cálculo:

$$\% \text{ Hb oxidada} = 100 - \frac{[A \text{ Hb} - A_{100}] \times 100}{A_0 - A_{100}}$$

Con $A = A_{540} + A_{576}$; $A \text{ Hb} = A_{540} + A_{576}$ de la muestra de hemoglobina; $A_0 = A_{540} + A_{576}$ del 0 % oxidado; $A_{100} = A_{540} + A_{576}$ de 100 % oxidado.

[0048] En cuanto al seguimiento de la estructura, los espectros se superponen para cada condición con el fin de visualizar el efecto de los excipientes en una semana, después la evolución de los porcentajes de oxidación es procesada gráficamente por el software Graphpad® para determinar la cinética de autooxidación en las diferentes condiciones ensayadas.

Seguimiento de la concentración

[0049] La hemoglobina se analiza por espectrofotometría con el reactivo de Drabkin que permite dosificar con precisión el hemo, sitio activo de la hemoglobina.

Los ensayos de eficacia

[0050] Para evaluar la eficacia de las hemoglobinas de *Arenicola marina* (HbAm) y *Nereis* (HbN), se han desarrollado dos modelos celulares en el laboratorio, cada uno representativo de las aplicaciones para las cuales las moléculas están dedicadas.

[0051] Para HbAm, se trata de un modelo celular que imita las condiciones de conservación de órganos en espera de trasplante. Se utiliza un ensayo de toxicidad celular para evaluar las lesiones inducidas por la

conservación en frío: este ensayo corresponde a la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH). La LDH es una enzima presente en el citosol de las células y su liberación en el sobrenadante del cultivo es el reflejo de una permeabilización de la membrana plasmática y, por lo tanto, de una muerte celular. La eficacia de HbAm se evalúa comparando el porcentaje de liberación de LDH en condiciones de conservación de órganos con y sin HbAm.

5

[0052] El segundo modelo desarrollado se basa en la aplicación de la molécula de HbN en el contexto de la bioproducción de proteínas recombinantes. La estirpe celular corresponde a una estirpe comúnmente utilizada para la bioproducción. Las células se siembran a una densidad celular determinada en presencia o ausencia de una cantidad conocida de HbN. Después de 4 días de cultivo, se miden la densidad celular y la viabilidad celular. La eficacia de HbN se evalúa comparando el crecimiento y la viabilidad celulares en condiciones de cultivo con y sin HbN.

10

Resultados para HbAm

15 **[0053]** Seguimiento de la estabilidad de HbAm después de la reconstitución (T_0) *Seguimiento de la concentración de hemoglobina después de la reconstitución*

[0054] Los resultados de la determinación de HbAm después de la reconstitución tras la etapa de liofilización indican una disminución en la concentración de Hb después de la reconstitución, independientemente de las condiciones de liofilización (véase la Figura 1. Leyenda: NL = No liofilizado; L = liofilizado; L + T = liofilizado con trehalosa; L + Aa = liofilizado con ácido ascórbico; L + M = liofilizado con manitol; L + S = liofilizado con sucrosa). Esta pérdida de menos del 10 % indica que la liofilización disminuye el poder hidrófilo de la molécula.

20

Seguimiento de estabilidad estructural en T_0

25

[0055] Los porcentajes de pureza a 280 nm y a 414 nm de HbAm son similares para las diversas composiciones ensayadas.

[0056] En vista de las desviaciones típicas, los resultados obtenidos muestran que no existe una diferencia significativa en la pureza entre las diferentes condiciones ensayadas. Por lo tanto, en T_0 , después de la reconstitución, la estructura cuaternaria de HbAm no se ve significativamente afectada ni por la liofilización ni por la presencia de los diferentes excipientes.

30

Seguimiento de la funcionalidad de HbAm reconstituida

35

[0057] Con el fin de evaluar mejor el impacto de la liofilización sobre la funcionalidad de la molécula después de la reconstitución (T_0), se miden el porcentaje de oxidación y las modificaciones de la firma espectrofotométrica de la hemoglobina.

40 **[0058]** El procedimiento de liofilización provoca la oxidación de la molécula en aproximadamente un 20 % con respecto a la molécula no liofilizada. Todos los excipientes ensayados, y en particular el ácido ascórbico y la trehalosa, muestran un efecto positivo en la protección de la molécula contra la oxidación.

[0059] La trehalosa y el ácido ascórbico permitieron a la vez proteger la molécula contra la oxidación inducida por el procedimiento de liofilización pero también reducir la proporción de molécula inicialmente oxidada.

45

[0060] El estudio de los espectros UV-Visible nos muestra que las diferentes condiciones ensayadas no afectan significativamente la funcionalidad de HbAm después de la reconstitución: las bandas de Soret, alfa y beta están presentes en las longitudes de onda de una hemoglobina funcional (*cf.* tabla 1). En el caso de la hemoglobina liofilizada sola, aunque se observa un 20 % de oxidación, la molécula permanece globalmente funcional.

50

Condiciones	Banda de Soret	Banda alfa	Banda beta	Funcionalidad
HbAm NL	414 nm	540 nm	574 nm	Oxihemoglobina
HbAm L	412 nm	538 nm	574 nm	
HbAm L + trehalosa	414 nm	538 nm	574 nm	
HbAm L + manitol	412 nm	538 nm	574 nm	
HbAm L - sucrosa	414 nm	538 nm	574 nm	
HbAm L + ácido ascórbico	414 nm	540 nm	574 nm	

Tabla 1: Longitudes de onda registradas en los espectros UV-visible en diferentes condiciones
 NL: No liofilizado
 L: Liofilizado

Conclusiones

5 **[0061]** Esta etapa preliminar muestra que la liofilización de HbAm no modifica la estructura cuaternaria de la molécula significativamente. Sin embargo, la liofilización provoca una oxidación parcial de la hemoglobina. Los resultados muestran que los excipientes ensayados permiten proteger la molécula de la oxidación inducida por el procedimiento de liofilización sin afectar su estructura cuaternaria. Además, entre los excipientes ensayados, la trehalosa y el ácido ascórbico son los mejores para proteger contra la oxidación.

10 Seguimiento de la estabilidad de HbAm durante 5 días

[0062] Este estudio se realiza en las muestras reconstituidas después de la liofilización con y sin excipientes y se comparan con la molécula no liofilizada.

15 **[0063]** Se reconstituyen en T₀ con agua ultrapura y luego se incuban a 37 °C para acelerar la degradación de la molécula para evaluar los efectos de los excipientes seleccionados. Los análisis de estructura, funcionalidad así como la determinación de la hemoglobina se realizan diariamente (D₀, D₁, D₂, D₃, D₄).

20 Seguimiento de la concentración de hemoglobina

[0064] Los resultados muestran una disminución relativa en la cantidad de hemoglobina. Esta disminución, característica de una degradación o adsorción de hemoglobina, se observa para la molécula no liofilizada, así como también se liofiliza en presencia de ácido ascórbico, manitol y sucrosa. No se observa ninguna disminución significativa para la molécula liofilizada sola y en presencia de trehalosa.

Seguimiento de la estructura cuaternaria

30 **[0065]** El porcentaje de pureza se mide a 280 nm con el tiempo. El procesamiento de datos (software Graphpad®) permite determinar una curva de tendencia característica de la cinética de degradación de las moléculas. Dos tendencias están surgiendo:

- Una regresión lineal para el conjunto de las condiciones excepto la trehalosa;
- Una meseta seguida por una fase de decrecimiento para la trehalosa.

35 **[0066]** Los resultados muestran que el ácido ascórbico parece mantener la integridad estructural de la molécula de HbAm.

[0067] De hecho:

- la molécula menos estable es la molécula liofilizada sola: $T_{1/2} = 2,9$ días y $k_d = 0,17j^{d-1}$; y
- 5 - la molécula liofilizada en presencia de trehalosa o ácido ascórbico es la más estable con $T_{1/2} = 5,4$ y $4,7$ días respectivamente, y $k_d = 0,12$ y $0,10 d^{-1}$ respectivamente.

Seguimiento de la funcionalidad

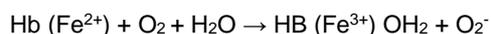
10 **[0068]** Al igual que con el seguimiento de la estructura, los datos de oxidación se analizaron con Graphpad® para determinar la cinética de oxidación de las moléculas.

[0069] La evolución del porcentaje de oxidación con el tiempo puede ser representada por un sigmoide del tipo dosis-respuesta para 3 condiciones: liofilizada sola; liofilizada con trehalosa y sucrosa.

15

[0070] El aspecto dosis-respuesta puede explicarse por una doble cinética; la primera corresponde a la autooxidación de la molécula: la transformación del hierro ferroso en hierro férrico y la formación de O_2 radical (O_2^-). El O_2 radical es una especie oxidante que cataliza la reacción de oxidación (ecuación a continuación).

20



[0071] El ácido ascórbico y la trehalosa "capturan" el O_2^- evitando su interacción con Hb: esto explica el perfil lineal de la cinética de oxidación en presencia de estos excipientes. El estudio de los espectros UV-visibles (resultados no presentados) muestra un mantenimiento de la funcionalidad de la hemoglobina hasta D3 para las
25 muestras compuestas de ácido ascórbico y hasta D2 para las que contienen trehalosa.

Conclusiones

[0072] Durante este estudio a corto plazo, se observó el predominio de dos excipientes para el
30 mantenimiento de la estructura, la funcionalidad y para una ralentización de la oxidación de la molécula una vez reconstituida; se trata de trehalosa y ácido ascórbico.

Evaluación de la efectividad de HbAm

35 **[0073]** Los resultados muestran que, para todas las condiciones ensayadas, en comparación con el control, es decir, solo en el medio de conservación, los porcentajes de liberación de LDH son inferiores. Esto muestra que HbAm es eficaz cualesquiera que sean las condiciones. Sin embargo, es más o menos eficaz en función de los excipientes utilizados durante la liofilización.

40 **[0074]** Se observa una diferencia significativa entre la molécula no liofilizada y la molécula liofilizada en presencia de ácido ascórbico, que es la más eficaz. Finalmente, la molécula liofilizada parece más eficaz que la molécula no liofilizada y que la molécula liofilizada + trehalosa.

Estudio de estabilidad de HbAm en estado liofilizado

45

[0075] Los resultados presentados en este caso son muy preliminares.

Seguimiento de la concentración de hemoglobina

50 **[0076]** La evolución de la concentración con el tiempo en las diferentes condiciones estudiadas muestra que no hay diferencias significativas hasta D₂. A partir de este día, la redispersión parece más difícil.

Seguimiento de la estabilidad estructural

55 **[0077]** Los resultados obtenidos para el seguimiento de la estructura cuaternaria de la molécula muestran perfiles sorprendentes en el caso de la molécula tratada con ácido ascórbico.

[0078] Los trazados no pudieron integrarse a partir del D₁. De hecho, el pico correspondiente a la hemoglobina está desestructurado.

[0079] Se realizó una comparación entre la pureza de la molécula liofilizada sola o con trehalosa.

[0080] En el caso de la molécula liofilizada, la curva describe una tendencia lineal ($R^2 = 0,9858$). La molécula añadida de trehalosa parece ser más estable. De hecho, el perfil de la curva muestra una ligera disminución entre D_0 y D_1 y luego una fase de estabilidad hasta D_3 .

Seguimiento de la estabilidad funcional

10 **[0081]** En vista de la evolución del porcentaje de oxidación, el ácido ascórbico y la trehalosa parecen ser igualmente eficaces. El primero describe una evolución lineal creciente, mientras que el segundo presenta un ligero aumento tras una fase de estabilidad. Estos experimentos deberán reproducirse para confirmar estas primeras observaciones.

15 Resultados de HbN

[0082] El conjunto de experimentos llevados a cabo en el contexto de seguimiento de estabilidad de HbAm se aplica a HbN.

20 Seguimiento de la estabilidad de HbN en T_0

Seguimiento de la concentración de hemoglobina en T_0

25 **[0083]** Los resultados de la determinación de hemoglobina después de la reconstitución de la molécula HbN en las diferentes condiciones no muestran una diferencia significativa entre la molécula no liofilizada, liofilizada + trehalosa y liofilizada + manitol. Sin embargo, se observa una pérdida de hemoglobina después de la liofilización de la molécula sola, añadida con sucrosa o ácido ascórbico.

30 **[0084]** En el caso presente, el manitol al igual que la trehalosa tienen un efecto positivo en la reconstitución.

Seguimiento de la estabilidad estructural de HbN después de la reconstitución

35 **[0085]** El porcentaje de pureza medido en T_0 a 280 nm (A) y 414 nm (B), no muestra, a la vista de las desviaciones típicas, ninguna diferencia significativa a 280 nm, y cualquiera que sea el estado de la molécula (liofilizada o no) y excipientes ensayados. Es lo mismo para el porcentaje de pureza a 414 nm. Por lo tanto, la liofilización no parece inducir la desestructuración de la molécula.

Seguimiento de la funcionalidad de la molécula de HbN en T_0

40 **[0086]** Se mide el porcentaje de oxidación relativo obtenido después de la liofilización y se calcula sobre la base de la molécula no liofilizada.

45 **[0087]** La monitorización del estado de oxidación de la molécula en T_0 muestra una oxidación del 35 % para la molécula liofilizada sola que es un 15 % superior a la molécula de HbAm. El conjunto de los excipientes ensayados ofrece a la hemoglobina una protección contra la oxidación. De hecho, el porcentaje de oxidación registrado en T_0 se comprende entre 10 % para la trehalosa y -20 % para el ácido ascórbico, que es el más protector. El efecto de la trehalosa es menos eficaz para HbN que para HbAm. Los espectros UV-visibles de las diferentes muestras presentan una superposición perfecta con una firma espectral de una hemoglobina funcional.

50 **[0088]** Por lo tanto, la funcionalidad de la molécula de HbN como HbAm no se ve afectada significativamente por el procedimiento de liofilización.

Conclusiones

55 **[0089]** Al final de esta etapa, el conjunto de los excipientes ensayados ofrece a la molécula un mantenimiento de su estructura, su funcionalidad y también una protección eficaz contra la oxidación particularmente con un tratamiento con sucrosa o ácido ascórbico. A diferencia de la HbAm, la trehalosa proporciona una protección contra la oxidación menos eficaz. De hecho, en el caso del HbN, la oxidación se reduce (10 %) pero no se elimina. La acción del conjunto de los excipientes ensayados será evaluada durante 5 días para seleccionar las más eficaces.

Seguimiento de la estabilidad de HbN reconstituida durante 5 días

Seguimiento de la concentración de hemoglobina

5

[0090] La evolución de la concentración de hemoglobina con el tiempo muestra que independientemente de la condición considerada, la concentración de hemoglobina permanece estable.

Seguimiento de la estructura cuaternaria

10

[0091] La evolución del porcentaje de pureza a 280 nm muestra que las diferentes cinéticas adoptan una tendencia lineal (Tabla 2).

Tabla 2: curvas de tendencia HbN y constantes asociadas (NL = HbN no liofilizado, L = HbN liofilizado)

15

Condición ensayada	Curva de tendencia	Ecuación	Constantes asociadas R ²		
			Semivida	T _{1/2} (d)	K _{d(j-1)}
NL			0,9755	0,1643 ± 0,01502	3,043
L			0,9874	0,1714 ± 0,01119	2,917
L + trehalosa			0,9737	0,1820 ± 0,01727	2,747
L + ácido ascórbico	Regresión lineal	$\frac{\% \text{ pureza } (t)}{\% \text{ pureza } (t_0)} = -k \times t$	0,9952	0,04049 ± 0,001995	12,348
L + manitol			0,9719	0,03847 ± 0,004627	12,997
L + sucrosa			0,9539	0,03423 ± 0,005324	14,607

[0092] Los datos muestran un mantenimiento de la estructura proteica proporcionada por la sucrosa (T_{1/2} = 14,607, k_d = 0,03423) manitol (T_{1/2} = 12,997, k_d = 0,03847) y ácido ascórbico (T_{1/2} = 12,348, k_d = 0,0409). Con respecto a la trehalosa (T_{1/2} = 2,747, k_d = 0,1820), se coloca al mismo nivel que las muestras liofilizadas o no.

20

Seguimiento de la funcionalidad

[0093] El seguimiento del porcentaje de oxidación de la hemoglobina revela un efecto protector proporcionado por la trehalosa hasta D4 con un porcentaje de oxidación inferior a 50 %. Los otros excipientes ensayados muestran un efecto antioxidante en T0 que se pierde gradualmente en los días siguientes hasta alcanzar el nivel de oxidación del control no liofilizado. El perfil de las curvas adopta una tendencia hiperbólica. La oxidación de la molécula es rápidamente catalizada por oxígeno radical. El estudio de los espectros UV-visibles obtenidos para las condiciones ensayadas muestra un mantenimiento de la funcionalidad hasta D3 cuando la hemoglobina se trata con trehalosa (resultados no expuestos en este caso).

30

Conclusiones

[0094] Al final de este seguimiento de una semana, se destacan dos excipientes: la trehalosa para el mantenimiento de la funcionalidad y la protección eficaz contra la oxidación; el ácido ascórbico para el mantenimiento de la estructura de la molécula. Otro excipiente podría ser conjugado con trehalosa, se trata de sucrosa. Para completar este estudio, se llevarán a cabo los ensayos de eficacia de la molécula formulada con estos excipientes.

35

Evaluación de la efectividad de HbN

40

[0095] El ensayo de eficacia de HbN se realiza en un modelo celular. Las mediciones realizadas se refieren al porcentaje de viabilidad (porcentaje de células vivas) y la densidad celular.

[0096] Los resultados muestran que la hemoglobina añadida de los diversos excipientes permanece efectiva

en las células. De hecho, las células permanecen viables en más del 95 % y la densidad celular aumenta significativamente en comparación con el control (X 1,7 en promedio).

[0097] Se observa una eficacia superior para la molécula liofilizada en presencia de ácido ascórbico así como para la molécula en estado liofilizado sin excipiente.

[0098] La trehalosa, a su vez, describe un perfil similar al de la molécula no liofilizada.

Estudio de estabilidad de HbN en estado liofilizado

10

[0099] Para este estudio, es necesario mantener el producto liofilizado en presencia o ausencia de excipientes a 37 °C para acelerar la degradación de la molécula. Luego se reconstituyen en agua para realizar los análisis de estructura, de función y de concentración.

15 *Seguimiento de la concentración de hemoglobina*

[0100] El seguimiento de la concentración de hemoglobina después de la reconstitución muestra el mismo perfil ya observado para HbAm. De hecho, no se observa ninguna diferencia significativa hasta D2 antes de comenzar una fase de disminución sinónimo de una redispersión difícil.

20

Seguimiento de la estructura cuaternaria

[0101] En cuanto a HbAm, los perfiles de los cromatogramas son sorprendentes para el ácido ascórbico, en particular con una desestructuración del pico característico de la hemoglobina.

25

Seguimiento de la funcionalidad

[0102] En el caso de HbN, la molécula liofilizada sola sin excipiente está muy fuertemente oxidada. Cuando se estudia el efecto de los excipientes seleccionados, la trehalosa proporciona una protección contra la oxidación que es estable de D1 a D3. Es lo mismo para el ácido ascórbico con un efecto protector superior. El perfil obtenido con un ligero aumento tras una fase de estabilidad es similar al de HbAm. Sin embargo, hay una diferencia significativa entre las dos moléculas en términos de porcentaje de oxidación inicial y final, que es dos veces más elevado para HbN.

35 **Ejemplo 2**

[0103]

• Se liofilizaron muestras de 20 ml de HbAm de la siguiente composición:

40

- Muestra A (control): HbAm en agua ultrapura;
- Muestra B: HbAm en una solución acuosa con 5 mM de ácido ascórbico;
- Muestra C: HbAm en una solución acuosa que comprende 55 mg/ml de trehalosa;
- Muestra D: HbAm en una solución acuosa que comprende 55 mg/ml de trehalosa y 5 mM de ácido ascórbico.

45

[0104] Estas muestras liofilizadas se redispersaron en i) agua ultrapura, ii) una solución acuosa con 5 mM de ácido ascórbico, iii) una solución de estabilización (= solución acuosa que comprende NaCl 90 mM, Na-gluconato 23 mM, CaCl₂ 2,5 mM, Na-acetato 27 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 5 mM, pH 7,1 + 0,5) o iv) solución iii) que comprende adicionalmente ácido ascórbico 5 mM.

50

[0105] La funcionalidad de los liofilizados redispersados obtenidos se midió como se indica en el ejemplo 1.

[0106] Los resultados muestran que la presencia de trehalosa durante la formulación limita la degradación de HbAm. El porcentaje de hemoglobina en las muestras C y D (es decir, con trehalosa) redispersadas, alrededor del 88 %, es significativamente superior al de las muestras A y B, en torno al 82-84 %.

[0107] Además, la presencia de ácido ascórbico durante la formulación limita la oxidación relacionada con la liofilización.

- Se llevaron a cabo experimentos de liofilización con una muestra E. Esta muestra E comprende HbAm en una solución acuosa que comprende Na-gluconato 23 mM, CaCl₂ 2,5 mM, Na-acetato 27 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 5 mM, pH 7,1 ± 0,5, 65 mg/ml de trehalosa y ácido ascórbico 5 mM.

5 La liofilización podría realizarse de manera muy satisfactoria.

Ejemplo 3

Material:

10 [0108] Aparato de liofilización de laboratorio LABCONCO

Procedimientos:

15 [0109] Alícuotas de 1 ml de HbAm (M101) o HbN (M201).

[0110] Las muestras de 1 ml se congelan antes de la liofilización y se distribuyen en viales como se indica en la Tabla 1 a continuación:

Referencia	Contenido	T de congelación
A	M101	-20 °C
B	M101	-80 °C
C	M201	-20 °C
D	M201	-80 °C
E	5 % de manitol	-20 °C
F	5 % de manitol	-80 °C

Tabla 1: resumen de las condiciones ensayadas. Las condiciones E y F son controles positivos de liofilización

20 [0111] Una vez congelados, los viales se colocan en el liofilizador.

Resultados:

25 *Resultados de liofilización:*

[0112] Después de la verificación, el congelador a -20 °C mostró una temperatura efectiva de -17 °C. Después de la carga, cuando el aparato está presurizado, las muestras A y B emergen en espuma del vial. La muestra C muestra una fusión parcial limitada. Las otras muestras que se encuentran en la zona "hielo" del diagrama de tensión de vapor permanecen estables. Después de 30 minutos, las muestras D, E y F comienzan una sublimación aparentemente en buenas condiciones pero fuera de control. Después de 6 horas de funcionamiento, el ensayo se detiene. Las muestras D, E y F se presentan en una hermosa pastilla con una cristalización claramente aparente. La muestra D tiene una superficie brillante que sugiere la formación de una piel debido a la congelación. La redispersión se realiza en unos pocos minutos, pero para la muestra E, existe presencia de algunos "grumos".

35 *Resultados de análisis por HPLC:*

[0113] Los análisis por HPLC se realizaron para verificar la pureza y la estructura de las hemoglobinas post-liofilización, y para verificar si no se degradaban durante la liofilización.

Muestras	% pureza (%)	Aglomerados (%)	Disociación (%)
M101 antes de la liofilización	91,80	4,01	1,49
M101 después de la liofilización	91,69	3,15	1,27
M201 antes de la liofilización	86,55	5,28	2,81
M201 después de la liofilización	82,32	5,60	4,39

Resultados de las determinaciones de Hb:

[0114] Las determinaciones de hemoglobina se realizaron antes y después de la liofilización, y una vez redispersada.

Muestras	Moléculas	Antes de la liofilización (mg/ml)	Después de la liofilización (mg/ml)
E	M201	46,83	40,06
F	M101	49,05	41,87

5 *Conclusión:*

[0115] La primera conclusión es que las 2 moléculas se liofilizan, ya que se han obtenido bonitas pastillas para las condiciones a -80 °C. De hecho, la congelación a -20 °C conduce a la fusión de las moléculas durante el vacío. La sublimación va bien, pero dada la duración de la manipulación, prácticamente no ha habido secado secundario, que, prolongado, solo podría mejorar en particular las condiciones de humedad y redispersión. Los resultados de los análisis por HPLC muestran que la molécula M201 experimenta una degradación parcial (~4 %) durante la liofilización. En cuanto a la molécula M101, es estable.

REIVINDICACIONES

1. Liofilizado que comprende al menos una hemoglobina extracelular de la familia *Arenicolidae* o de la familia *Nereididae*, y un agente estabilizante seleccionado entre disacáridos.
5
2. Liofilizado según la reivindicación 1, en el que la hemoglobina extracelular se selecciona entre la hemoglobina extracelular de *Arenicola marina* y la hemoglobina extracelular de *Nereis*.
3. Liofilizado según una de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el disacárido se selecciona entre
10 trehalosa y sacarosa.
4. Liofilizado según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el agente estabilizante también comprende un poliol y un antioxidante, preferentemente el poliol se selecciona entre manitol y sorbitol; y preferentemente el antioxidante es ácido ascórbico.
15
5. Procedimiento de preparación de un liofilizado según una de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende:
20
 - i) la mezcla de una solución que comprende al menos una hemoglobina extracelular de la familia *Arenicolidae* o de la familia *Nereididae* con un agente estabilizante seleccionado entre disacáridos,
 - ii) la congelación de la mezcla obtenida en i) a una temperatura comprendida entre -10 °C y -100 °C, preferentemente entre -20 °C y -100 °C durante un tiempo de al menos 24 h;
 - iii) la sublimación de la mezcla congelada obtenida en ii) durante al menos 2 h al vacío;
 - iv) el secado final de la mezcla obtenida en iii) hasta que se obtiene un polvo.
- 25 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el agente estabilizante seleccionado entre disacáridos está presente en la mezcla de la etapa i) a una concentración comprendida entre 1 y 500 mg/ml.
7. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el agente estabilizante también comprende un poliol
30 y un antioxidante, el antioxidante está presente en la mezcla de la etapa i) en una concentración comprendida entre 3 y 20 mM.
8. Procedimiento según la reivindicación 5 a 7, en el que el disacárido presente en la mezcla de la etapa i) se selecciona entre trehalosa o sacarosa presente en una concentración comprendida entre 50 y 70 mg/ml, de
35 manera preferente aproximadamente 55 mg/ml o 65 mg/ml, trehalosa o sacarosa presente en una concentración de aproximadamente 100 mg/ml.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 a 8, en el que la etapa de congelación ii) se lleva a
40 cabo a una temperatura comprendida entre -10 °C y -90 °C, preferentemente entre -20 °C y -90 °C, durante al menos 24 h.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 a 9, en el que la sublimación de la etapa iii) se lleva a cabo durante al menos 4 h.

Figura 1

