

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 989**

51 Int. Cl.:

A61K 9/08	(2006.01)
A61K 9/19	(2006.01)
A61K 31/10	(2006.01)
A61K 31/131	(2006.01)
A61K 31/14	(2006.01)
A61K 33/06	(2006.01)
A61K 33/08	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2011 PCT/GB2011/000497**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2011 WO11121305**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2011 E 11712653 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2552410**

54 Título: **Método de conservación de adyuvantes de alumbre y vacunas potenciadas con alumbre**

30 Prioridad:

31.03.2010 GB 201005522
31.03.2010 GB 201005518

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2019

73 Titular/es:

STABILITECH BIOPHARMA LTD (100.0%)
Unit 6, Sovereign Business Park, Albert Drive,
Burgess Hill
West Sussex, RH15 9TY, GB

72 Inventor/es:

DREW, JEFFREY;
WOODWARD, DAVID y
CORTEYN, AMANDA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 708 989 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

Método de conservación de adyuvantes de alumbre y vacunas potenciadas con alumbre

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un método para conservar un adyuvante de sal de aluminio durante la congelación o liofilización, típicamente durante la congelación o liofilización de una preparación de vacuna que comprende un adyuvante de sal de aluminio y uno o más antígenos de vacuna.

10

Antecedentes de la invención

Los adyuvantes de sal de aluminio son actualmente los adyuvantes más ampliamente usados para vacunas humanas y veterinarias. Los compuestos adyuvantes de aluminio incluyen sales de aluminio tales como el fosfato de aluminio (AIPO₄) y el hidróxido de aluminio (Al(OH)₃) que se denominan genéricamente en el campo de los adyuvantes de vacunas "alumbre". Para proporcionar una inmunogenicidad adecuada, se cree que los antígenos deben ser adsorbidos en la superficie del adyuvante. Se cree que los adyuvantes de alumbre actúan como un estímulo del sistema inmunitario y proporcionan una liberación prolongada de antígeno en el sitio de administración (por ejemplo, mediante inyección) proporcionando así una liberación gradual y continua de antígeno para estimular la producción de anticuerpos. Los adyuvantes de aluminio en su forma natural se conocen comúnmente como geles, que son suspensiones de partículas en medios acuosos.

15

20

25

El almacenamiento y transporte de vacunas potenciadas con alumbre es problemático. El secado por congelación (liofilización) es un proceso que se usa con frecuencia para mejorar la estabilidad a largo plazo de diversas preparaciones de proteínas. No obstante, las composiciones de vacunas comerciales que contienen adyuvantes de sal de aluminio no se pueden liofilizar sin dañar la estructura del adyuvante. La liofilización provoca el colapso de la estructura de gel del adyuvante, lo que da como resultado la agregación y precipitación de la sal de adyuvante en la resuspensión en agua. El efecto es reducir significativamente la inmunogenicidad de la vacuna.

30

El documento WO 01/93829 describe un método para preparar una vacuna potenciada que comprende secado por pulverización o liofilización por pulverización de una solución acuosa que comprende:

(a) de 0,1 a 0,95 % en peso de un adyuvante de sal de aluminio o sal de calcio que tiene un antígeno adsorbido en él;

35

(b) de 0,5 a 6 % en peso de un sacárido;

(c) de 0,1 a 2 % en peso de un aminoácido o sal del mismo; y

(d) de 0,02 a 1 % en peso de una sustancia coloidal.

40

El documento WO 2008/118691 describe un método para preparar una composición de vacuna seca unida a adyuvante inmunológicamente activa que comprende (a) combinar al menos un adyuvante de sal de aluminio, al menos un sistema tampón, al menos un agente formador de vidrio y al menos un antígeno para crear una formulación de vacuna líquida; (b) congelar la formulación de vacuna líquida para crear una formulación de vacuna congelada; y (c) liofilizar la formulación de vacuna congelada para crear una composición de vacuna seca. El agente formador de vidrio es preferentemente trehalosa.

45

Sumario de la invención

Sorprendentemente, los presentes inventores descubrieron que el daño estructural a un adyuvante de sal de aluminio puede reducirse por congelación o liofilización, en particular por liofilización, del adyuvante en presencia de una N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma. La presencia adicional de uno o más azúcares puede llevar a una reducción adicional del daño estructural al adyuvante durante la congelación o la liofilización.

50

En consecuencia, la presente invención proporciona un método para conservar un adyuvante de sal de aluminio durante la congelación o liofilización que comprende congelar o liofilizar una suspensión o solución acuosa que comprende:

55

(a) un adyuvante de sal de aluminio;

(b) una N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma;

60

y

(c) uno o más azúcares.

La presente invención también proporciona:

65

- el uso de un excipiente que comprende (i) una N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma y (ii) uno o más azúcares, para conservar un adyuvante de sal de aluminio

- durante la congelación o liofilización;
- una composición de vacuna que comprende: un adyuvante de sal de aluminio; uno o más antígenos; N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma; y uno o más azúcares.
- 5 - una composición de vacuna que puede obtenerse mediante el método de la invención; y
- el uso de un excipiente que comprende (i) una N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma y (ii) uno o más azúcares, como agente de resuspensión para una composición de vacuna.
- 10 Las composiciones de vacunas congeladas o liofilizadas facilitan el almacenamiento adecuado y maximizan la vida útil de las composiciones. Las composiciones pueden almacenarse apiladas durante periodos de tiempo prolongados. La inmunogenicidad, la potencia y la eficacia de las vacunas pueden así mantenerse. La N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma y el azúcar o azúcares actúan como crioprotectores y protegen los adyuvantes de sal de aluminio contra las tensiones encontradas durante la congelación
- 15 y también como un lioprotector durante la liofilización.

Breve descripción de las figuras

- 20 La Figura 1 muestra los resultados del análisis microscópico de adyuvantes en los ejemplos de referencia después de congelar el gel de hidróxido de aluminio. El estudio de panel A muestra un ejemplo de estructura normal no dañada y el estudio de panel B muestra una estructura cristalina aglomerada dañada después de la congelación del adyuvante de hidróxido de aluminio.
- 25 La Figura 2 muestra los resultados de un ensayo de aglomeración de adyuvante después de congelar un gel de hidróxido de aluminio en presencia de diversas concentraciones de sacarosa y dimetilglicina (DMG) en el Ejemplo 1.
- 30 La Figura 3 muestra la recuperación del adyuvante (Al(OH)₃) después de la congelación y descongelación en las formulaciones descritas en el Ejemplo 2 que contienen sacarosa y/o trimetilglicina (TMG) según se evaluó mediante un ensayo de aglomeración.
- 35 La Figura 4 muestra la recuperación del adyuvante (Al(OH)₃) después de la congelación y descongelación en las formulaciones descritas en el Ejemplo 2 que contienen sacarosa y/o S-metil-L-metionina (SMM) o metilsulfonilmetano (MSM) según se evaluó mediante un ensayo de aglomeración.
- 40 La Figura 5 muestra los resultados de un ensayo de aglomeración de adyuvante después de la liofilización de un gel de hidróxido de aluminio en presencia de diversas concentraciones de sacarosa y dimetilglicina (DMG), trimetilglicina (TMG), S-metil metionina (SMM) o sarcosina en el Ejemplo 3.
- 45 La Figura 6 muestra el porcentaje de ASB unido al adyuvante en el Ejemplo 6 en comparación con el control.
- 50 La Figura 7 muestra la concentración de ASB unida al adyuvante en el Ejemplo 6.
- 55 La Figura 8 muestra los resultados de la transferencia puntual del Ejemplo 7. La Figura 8A muestra la transferencia puntual de las muestras expuestas en la Tabla 19 almacenadas a 4 °C. La Figura 8B muestra la transferencia puntual de las muestras expuestas en la Tabla 19 almacenadas a -80 °C.
- 60 La Figura 9 muestra más resultados de transferencia puntual del Ejemplo 7. La Figura 9A muestra la transferencia puntual de las muestras expuestas en la Tabla 20 almacenadas a 4 °C. La Figura 9B muestra la transferencia puntual de las muestras expuestas en la Tabla 20 almacenadas a -80 °C.

Descripción detallada de la invención

45 Sumario

50 La presente invención se refiere a la reducción y/o prevención de daños estructurales a los adyuvantes de vacunas de sal de aluminio cuando se congelan o se liofilizan, especialmente cuando se liofilizan. Dicho daño estructural se reduce o evita al congelar o liofilizar el adyuvante en presencia de una N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma y (ii) uno o más azúcares.

55 El adyuvante de sal de aluminio, en el que típicamente se adsorbe al menos un antígeno, se pone en contacto con la N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma en solución acuosa. A continuación, la composición acuosa resultante, en la que también pueden estar presentes uno o más azúcares, se congela o se liofiliza. Cuando está presente un antígeno, el método es un método para preparar una composición de vacuna que comprende un adyuvante de sal de aluminio y al menos un antígeno. Una preparación de vacuna que comprende el adyuvante de aluminio puede descongelarse o reconstituirse después de congelar o liofilizar, respectivamente, antes de la administración de la preparación de vacuna a un paciente.

60 La invención permite conservar la estructura y función del adyuvante de aluminio durante la etapa de congelación o liofilización. La inmunogenicidad de las vacunas potenciadas con aluminio después de la congelación o la liofilización se puede mantener en consecuencia.

65

Adyuvante de sal de aluminio

En la invención se puede usar cualquier tipo de sal de aluminio adecuada para su uso como adyuvante. La sal de aluminio puede ser hidróxido de aluminio (Al(OH)₃), fosfato de aluminio (AlPO₄), clorhidrato de aluminio, sulfato de aluminio, alumbre de amonio, alumbre de potasio o silicato de aluminio. Preferentemente, el adyuvante de sal de aluminio usado es hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio. Más preferentemente, el adyuvante de sal de aluminio es hidróxido de aluminio (Al(OH)₃).

Típicamente, el adyuvante de sal de aluminio toma la forma de un gel hidratado hecho de una sal de aluminio, siendo el gel hidratado una suspensión de partículas en medios acuosos. La preparación de adyuvantes de sal de aluminio es bien conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los adyuvantes de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio se preparan generalmente exponiendo soluciones acuosas de iones de aluminio (típicamente como sulfatos o cloruros) a condiciones alcalinas en un entorno químico bien definido y controlado, como saben los expertos en la técnica. Dichos métodos se pueden usar, por ejemplo, para preparar un gel hidratado con hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.

Antígeno

Un antígeno adecuado para su uso en la invención incluye cualquier componente inmunogénico de una vacuna. Por lo tanto, el antígeno puede ser una proteína, una proteína bacteriana específica, una mucoproteína, una glucoproteína, un péptido, una lipoproteína, un polisacárido, un peptidoglicano, una nucleoproteína o una proteína de fusión.

El antígeno puede obtenerse de un microorganismo (tal como una bacteria, virus u hongo), un protozoo, un tumor, una célula maligna, una planta, un animal, un ser humano o un alérgeno. En una realización, el antígeno es una proteína pero excluye un virus o virión completo.

El antígeno puede ser sintético, por ejemplo, procedente de técnicas de ADN recombinante. El antígeno puede ser un antígeno relacionado con una enfermedad, tal como un antígeno relacionado con un patógeno, un antígeno relacionado con un tumor, un antígeno relacionado con una alergia, un antígeno relacionado con un defecto neural, un antígeno de enfermedad cardiovascular, un antígeno relacionado con la artritis reumatoide. El antígeno puede ser una toxina inactivada o atenuada/detoxificada (toxóide).

En particular, los agentes patógenos de los cuales se obtiene el inmunógeno de la vacuna pueden incluir virus del papiloma humano (VPH), VIH, VSH2/VSH1, virus de la influenza (tipos A, B y C), virus de la parainfluenza, virus de la polio, virus VRS, rinovirus, rotavirus, virus de la hepatitis A, virus del Norwalk, enterovirus, astrovirus, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la varicela zoster, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, adenovirus, virus de la rubeola, virus del linfoma de células T humano tipo I (VLTH-I), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis D, poxvirus, virus vaccinia, Salmonella, Neisseria, Borrelia, clamidia, Clostridium tales como *C. difficile* y *C. tetani*, Bordetella tal como *Bordetella pertussis*, Corynebacterium tales como *C. diphtheriae*, Plasmodium, Coxoplasma, Pneumococcus, Meningococcus, Cryptococcus, Streptococcus, Vibrio cholerae, Staphylococcus, Haemophilus, Bacillus tal como *Bacillus anthracis* (ántrax), Escherichia, Candida, *Aspergillus*, Entamoeba, Giardia y Tripanosoma.

La vacuna puede usarse además para estimular una respuesta inmunitaria adecuada contra numerosas enfermedades veterinarias. Por lo tanto, el antígeno de la vacuna se puede obtener de un virus de la fiebre aftosa (incluidos los serotipos O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia-1), coronavirus, virus de la lengua azul, virus de la leucemia felina, virus de la influenza aviar, virus de la hendra y nipah, pestivirus tales como el virus de la diarrea viral bovina y el parvovirus canino.

Los antígenos asociados a tumores incluyen, por ejemplo, antígenos asociados a melanoma, antígenos asociados a cáncer mamario, antígenos asociados a cáncer colorrectal o antígenos asociados a cáncer de próstata.

Un antígeno relacionado con alérgenos incluye cualquier antígeno alérgeno adecuado para su uso en una vacuna para estimular la supresión de una reacción alérgica en un individuo al que se administra la vacuna (por ejemplo, antígenos procedentes de pólenes, ácaros del polvo, insectos, alérgenos alimentarios, polvo fino, tóxicos, toxinas, venenos y parásitos).

N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma

La N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina puede estar presente como una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma.

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

El éster es típicamente un éster de alquilo C₁₋₆, preferentemente un éster de alquilo C₁₋₄. Por lo tanto, el éster puede

ser el éster metílico, etílico propílico isopropílico butílico isobutílico o terc-butílico. Se prefiere el éster etílico.

Como se usa en el presente documento, un grupo alquilo C₁₋₆ es preferentemente un grupo alquilo C₁₋₄. Los grupos alquilo preferentes se seleccionan de entre metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo y terc-butilo. El metilo y el etilo son particularmente preferentes.

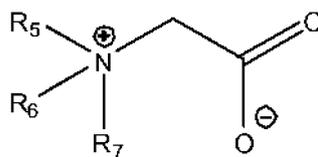
Para disipar cualquier duda, las definiciones de N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina también incluyen compuestos en los que el anión carboxilato está protonado para proporcionar -COOH y el catión amonio está asociado con un anión farmacéuticamente aceptable. Además, para disipar cualquier duda, los compuestos definidos anteriormente se pueden usar en cualquier forma tautomérica o enantiomérica.

N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina

El grupo alquilo es típicamente un grupo alquilo C₁₋₄. Los grupos alquilo preferentes se seleccionan de entre metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo y terc-butilo. El metilo y el etilo son particularmente preferentes.

Los compuestos preferentes son N,N-dimetilglicina o N,N,N-trimetilglicina o sales o ésteres fisiológicamente aceptables de los mismos. La N,N-dimetilglicina también se denomina dimetilglicina (DMG) o ácido 2- (dimetilamino)-acético. La N,N,N-trimetilglicina se denomina trimetilglicina (TMG).

La N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina puede ser un derivado de glicina de fórmula (IA) o una sal o éster fisiológicamente aceptables del mismo:



(IA)

en la que R₅ y R₆ representan independientemente alquilo C₁₋₆, por ejemplo, alquilo C₁₋₄ tal como metilo o etilo; y R₇ representa alquilo C₁₋₆, por ejemplo, alquilo C₁₋₄ tal como metilo o etilo. Los compuestos preferentes de fórmula (IA) son trimetilglicina (TMG) y sales o ésteres fisiológicamente aceptables de la misma.

30 **Azúcares**

Los azúcares adecuados para su uso en la presente invención incluyen azúcares reductores tales como glucosa, fructosa, gliceraldehídos, lactosa, arabinosa y maltosa; y preferentemente azúcares no reductores tales como sacarosa y rafinosa. El azúcar puede ser un monosacárido, disacárido, trisacárido u otros oligosacáridos. El término "azúcar" incluye alcoholes de azúcar.

Se prevén monosacáridos tales como galactosa y manosa; disacáridos tales como sacarosa, lactosa y maltosa; trisacáridos tales como rafinosa y tetrasacáridos tales como estaquiosa. La trehalosa, la umbeliferosa, la verbascosa, la isomaltosa, la celobiosa, la maltulosa, la turanosa, la melezitosa y la melibiosa también son adecuadas para su uso en la presente invención. Un alcohol de azúcar adecuado es el manitol.

Dos o más azúcares pueden estar presentes. Se pueden usar dos, tres o cuatro azúcares. Cuando uno o más azúcares están presentes en la suspensión acuosa que está congelada o liofilizada, preferentemente están presentes sacarosa o sacarosa y rafinosa. La sacarosa es un disacárido de la glucosa y la fructosa. La rafinosa es un trisacárido compuesto de galactosa, fructosa y glucosa.

Suspensión acuosa para congelar o liofilizar

La suspensión o solución acuosa a congelar o liofilizar se puede preparar mezclando el adyuvante de sal de aluminio con una solución acuosa de N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptables de la misma. La N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma pueden, en particular, seleccionarse de entre dimetilglicina y trimetilglicina. Se puede usar cualquier solución acuosa adecuada. La solución puede ser tamponada. La solución puede ser una solución de HEPES, tamponada con Tris, tamponada con fosfato o de agua pura.

Se disuelven uno o más azúcares en la solución acuosa antes de mezclarlos con el adyuvante. Como alternativa, el

azúcar o los azúcares se pueden mezclar con la suspensión del adyuvante en la solución acuosa de la N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptables de la misma.

5 Cuando están presente, el antígeno o los antígenos generalmente se adsorben sobre el adyuvante antes de mezclar el adyuvante con la solución acuosa de la N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptables de la misma. Los adyuvantes se pueden preparar en forma de gel hidratado y el antígeno se adsorbe en el gel hidratado. La adsorción de antígenos se puede llevar a cabo usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, para determinados antígenos proteicos, la adsorción se puede llevar a cabo mejor en un intervalo de pH en el que el adyuvante y el antígeno tendrán cargas eléctricas opuestas, facilitando la atracción electrostática y la adsorción. La adsorción de proteínas para una combinación particular de antígeno-adyuvante dependerá de la naturaleza del antígeno y del entorno químico (pH, fuerza iónica, presencia de tensioactivos etc).

15 Las concentraciones de la N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptables de la misma y del azúcar o cada azúcar en la suspensión o solución acuosa puede congelarse o puede determinarse por experimentación habitual. Por lo tanto se pueden seleccionar concentraciones optimizadas. La N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma puede actuar de forma sinérgica con el azúcar o los azúcares para mejorar la estabilidad.

20 Las concentraciones de la N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptables de la misma en la suspensión o solución acuosa está típicamente en el intervalo de 0,001 M o más, preferentemente en el intervalo de 0,01 M y, más preferentemente 0,1 M o más, por ejemplo de 0,1 M a 5,0 M. La concentración particular que se emplea dependerá de varios factores que incluyen, cuando están presentes, la naturaleza del antígeno; la N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina particular o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma que se usa; si se está usando uno o más azúcares y la identidad del azúcar o los azúcares; y el procedimiento particular de congelación o liofilización que se adopte.

Por lo tanto:

30 - La concentración de una N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o un compuesto de fórmula (IA), tal como TMG, o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma es preferentemente de 0,01 M a 5 M, de 0,1 M a 5 M, de 0,2 M a 5,0 M o de 0,1 M a 1 M.

- La concentración de una N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina tal como una N,N-dimetilglicina o N,N,N-trimetilglicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma es típicamente de 0,01 M o más y preferentemente 0,1 M o más, por ejemplo de 0,1 M a 5,0 M, de 0,33 M a 5,0 M, de 0,5 M a 4 M o de 0,5 M a 3 M.

35 - La concentración de N,N-dimetilglicina (DMG) o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma es típicamente de 0,01 M o más y preferentemente de 0,1 M o más, por ejemplo de 0,1 M a 5,0 M, de 0,33 M a 5,0 M, de 0,5 M a 4 M o de 0,5 M a 3 M. Se puede emplear menos DMG o sal o éster de DMG cuando están presentes uno o más azúcares.

40 La concentración de azúcar o la concentración total de azúcar en la suspensión o solución acuosa que se va a congelar o liofilizar es típicamente de 1 M o menos o de 0,7 M o menos, por ejemplo de 0,5 M o menos o de 0,29 M o menos. Una solución de sacarosa al 10 % p/v tiene una concentración de sacarosa de 0,29 M. La concentración de azúcar o la concentración total puede ser de 0,1 mM, de 0,5 mM, de 0,073 M o de 0,146 M.

45 Cuando la N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma es DMG o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma, la concentración de azúcar en la suspensión o solución acuosa para congelar o liofilizar es típicamente de 1 M o menos o de 0,7 M o menos, por ejemplo de 0,5 M o menos o de 0,29 M o menos. Una solución de sacarosa al 10 % p/v tiene una concentración de sacarosa de 0,29 M. Preferentemente, la concentración del azúcar tal como sacarosa o rafinosa o, si está presente más de un azúcar, la concentración total de azúcar es de 0,5 M o menos, 0,2 M o menos, 0,1 M o menos o 10 mM o menos. La concentración mínima del azúcar o, si está presente más de un azúcar, la concentración total mínima de azúcar puede ser 0,01 M, 0,1 M o 0,2 M. La concentración de azúcar, por ejemplo la concentración de sacarosa o rafinosa, o la concentración total si está presente más de un azúcar puede ser por lo tanto de 0,01 M a 0,7 M, de 0,029 M a 0,5 M, de 0,058 M a 0,3 M o de 0,1 M a 0,3 M. Cuando el azúcar es sacarosa, la concentración de sacarosa es preferentemente de 0,01 a 0,2 M y la concentración de DMG o una sal o éster de la misma es preferentemente de 0,2 a 2 M.

60 La concentración particular que se emplee dependerá de varios factores que incluyen la naturaleza del antígeno, la N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina particular o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma que se usa y el procedimiento particular de congelación o liofilización que se adopte. La concentración de azúcar o la concentración total puede ser de 0,1 mM a 0,7 M, de 5 mM a 0,7 M, de 0,073 M a 0,5 M o de 0,146 M a 0,389 M.

Cuando el azúcar es manitol, la concentración de manitol es típicamente de 0,2 a 1 M o de 0,2 a 0,8 M, preferentemente de 0,25 a 0,6 M o de 0,4 a 0,8 M, por ejemplo de 0,5 a 0,6 M.

65 La concentración más efectiva de la N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma dependerá del tipo particular de compuesto usado, el azúcar y el tipo de

adyuvante de sal de aluminio que se usa, por ejemplo, si se usa un adyuvante de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio. Usando una mezcla de una N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma junto con un azúcar, los inventores han demostrado que se pueden usar concentraciones más bajas de cada componente para lograr el mismo nivel de protección del adyuvante que el obtenido cuando cada componente se usa por separado.

Se sabe que las soluciones altamente concentradas de azúcares producen reacciones específicas del sitio cuando se inyectan en pacientes preparaciones de vacunas que contienen dichos azúcares concentrados. Por lo tanto, la invención tiene la ventaja de que se pueden usar concentraciones más bajas de azúcares cuando se combina con una N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma. Como resultado, cuando dichas preparaciones de vacuna se reconstituyen o descongelan, la concentración de azúcar se reduce y la probabilidad de reacción específica del sitio se minimiza.

Congelación/lioofilización

Congelación

La congelación se realiza por cualquier método adecuado. Por lo tanto, la congelación se puede llevar a cabo sumergiendo en nitrógeno líquido o en vapor de nitrógeno líquido, colocando en un congelador a una temperatura de -4 °C a -80 °C o usando un baño de hielo seco y alcohol. A presión atmosférica, se pueden usar temperaturas tales como -4 °C o menos, -10 °C o menos, -15 °C o menos, -20 °C o menos, -25 °C o menos.

Liofilización

Típicamente, la liofilización se logra por liofilización o por liofilización por pulverización. Al reducir el agua en el material y sellar el material en un vial, el material se puede fácilmente almacenar, enviar y reconstituir más tarde a su forma original. Las condiciones de secado pueden optimizarse adecuadamente mediante experimentación habitual.

En el secado, se forma una composición que incorpora las partículas virales. Se produce por lo tanto una matriz que incorpora las partículas virales. La composición es típicamente un sólido amorfo. Por lo tanto, generalmente se forma una matriz sólida amorfa. Por "amorfo" se entiende no estructurado y que no tiene una organización regular o repetida observable de moléculas (es decir, no cristalina). El procedimiento de liofilización puede efectuarse para formar una torta amorfa.

La liofilización se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos convencionales. Hay tres etapas principales: congelación, secado primario y secado secundario. La congelación se realiza típicamente usando una máquina de liofilización. En esta etapa, es importante enfriar el material biológico por debajo de su punto eutéctico, la temperatura más baja a la que pueden coexistir la fase sólida y líquida del material. Esto asegura que se producirá la sublimación en lugar de la fusión en las siguientes etapas. Como alternativa, los materiales amorfos no tienen un punto eutéctico, pero sí tienen un punto crítico, por debajo del cual se debe mantener el producto para evitar que se derrita o colapse durante el secado primario y secundario.

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

En el proceso de secado secundario, se elimina el agua de hidratación mediante la aplicación adicional de calor. Típicamente, la presión también se disminuye para fomentar el secado adicional. Después de completarse el proceso de liofilización, el vacío puede interrumpirse con un gas inerte tal como el nitrógeno antes del sellado o el material se puede sellar al vacío.

En otra realización, la liofilización se consigue mediante liofilización por pulverización de las partículas virales mezcladas con la mezcla de conservación de la invención. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica e implican un método de liofilización de una alimentación líquida a través de nitrógeno líquido. La alimentación líquida se atomiza en una pulverización de gotitas. Las gotitas se secan luego por contacto con el nitrógeno líquido.

Uso de las composiciones de la invención

Las composiciones de vacuna congeladas o liofilizadas se convierten en forma líquida (solución acuosa) antes de la administración a un paciente. Una composición congelada se descongela y se diluye según sea necesario con, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato o agua para inyecciones. Una composición liofilizada se reconstituye como una solución acuosa, por ejemplo mediante solución salina tamponada con fosfato o agua para inyecciones. La solución acuosa resultante se puede administrar luego, por ejemplo, mediante inyección, a un paciente que necesita vacunación.

La N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma y uno o más azúcares, típicamente actúa como un agente de resuspensión para la composición de la vacuna, por ejemplo, cuando se convierte en forma líquida (solución acuosa) antes de la administración a un paciente.

5

Protección contra los efectos adversos de la congelación o liofilización

Los adyuvantes de sal de aluminio en su forma natural están comúnmente en forma de geles que son suspensiones de partículas en medios acuosos. La congelación o el secado a menudo causan alteraciones estructurales caracterizadas por un aumento en el tamaño de las partículas con las correspondientes velocidades de sedimentación incrementadas y un empaquetamiento más apretado de los compuestos sólidos sedimentados. Sin embargo, usando la presente invención, se puede reducir el daño en forma de tamaño de partícula aumentado, velocidad de sedimentación aumentada y/o empaquetamiento más apretado de sólidos sedimentados como resultado de la congelación o la liofilización.

10

El daño estructural en forma de un mayor tamaño de partícula con las correspondientes velocidades de sedimentación incrementadas y el empaquetamiento más apretado de los compuestos sólidos sedimentados se puede evaluar mediante el ensayo de aglomeración de adyuvantes descrito en el Ejemplo 1. También se pueden usar otros métodos analíticos para evaluar las características fisicoquímicas de los adyuvantes de aluminio antes y después de la congelación o liofilización. Por ejemplo, las distribuciones de tamaño de partícula de las partículas de gel de aluminio pueden obtenerse mediante análisis de difracción láser, difracción de rayos X o espectroscopia infrarroja. La microscopía también se puede usar para visualizar cambios estructurales.

15

Los siguientes ejemplos ilustran la invención. También se proporciona un ejemplo de referencia.

20

Ejemplo de referencia

Adyuvante

El gel de hidróxido de aluminio (Al(OH)₃) se obtuvo en Sigma (A8222) en forma de una solución de 13 mg/ml (con un pH de 6,8).

25

Congelación del adyuvante

El adyuvante se congeló colocándolo en un congelador de laboratorio donde se dejó durante una noche a -20 °C. Luego se dejó descongelar y equilibrar a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C).

30

Análisis microscópico

Los adyuvantes se examinaron microscópicamente con un aumento de 100 veces. Ejemplos de la estructura amorfa normal no dañada y la estructura cristalina aglomerada dañada después de la congelación del hidróxido de aluminio se muestran en la Figura 1. La fotografía A muestra la suspensión en partículas distribuida uniformemente de adyuvante no dañado en comparación con la fotografía B que muestra la formación de grandes estructuras de cristal plano aglomeradas típicas de adyuvante dañado por congelación.

35

Ejemplo 1

Métodos

El adyuvante de hidróxido de aluminio se obtuvo en Sigma (A8222) en forma de una solución de 13 mg/ml a pH 6,8. Inicialmente, se añadieron volúmenes de 50 µl del hidróxido de aluminio a 100 µl de volúmenes de sacarosa y/o un excipiente adicional diluido en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS) en pocillos de microplacas de fondo plano de 96 pocillos. El excipiente adicional fue DMG. En la Tabla 1 a continuación se puede ver una lista de las concentraciones finales de DMG y sacarosa antes de la congelación.

40

Los adyuvantes se congelaron a -20 °C. Después de aproximadamente 18 horas, las muestras que contenían Al(OH)₃ se descongelaron y se evaluaron los niveles de sedimento como se describe mediante el ensayo de aglomeración de adyuvantes que se describe a continuación.

45

50

55

60

Tabla 1

Excipiente	Concentración de excipiente (M)	Concentración de sacarosa (mM)
DMG	1	234
DMG	0,33	234
DMG	0,1	234
DMG	0	234
DMG	1	117
DMG	0,33	117
DMG	0,1	117
DMG	0	117
DMG	1	58
DMG	0,33	58
DMG	0,1	58
DMG	0	58
DMG	1	29
DMG	0,33	29
DMG	0,1	29
DMG	0	29
DMG*	1	0
DMG*	0,33	0
DMG*	0,1	0
DMG*	0	0
* indica un ejemplo de referencia		

Ensayos de aglomeración de adyuvante

- 5 La cantidad de aglomeración se evaluó tomando muestras de cada pocillo en micropipetas de 100 µl, permitiendo que el reasentamiento se produjera durante 1 hora a temperatura ambiente y luego midiendo la altura del gel sedimentado como un porcentaje de la altura total de la solución en la pipeta. La altura del gel sedimentado como porcentaje de la altura total de la solución en la pipeta se expresó como % de volumen de gel. Cuanto mayor sea el % de volumen de gel, más estructuralmente intacto será el adyuvante.

10 Resultados y análisis

Los resultados de estos estudios se muestran en dos formas en la Figura 2. En primer lugar, se muestran diagramas de dispersión XY simples y esto se complementa con gráficos de hoja 3D.

- 15 En ausencia de cualquier DMG o sacarosa, solo se midió una recuperación del adyuvante del 30 %, lo que indica que se había producido una pérdida muy significativa en la estructura del adyuvante durante la congelación y descongelación (pérdida del ~70 %). El aumento de la concentración de sacarosa en la formulación aumentó la recuperación del adyuvante hasta un máximo de ~70 % a la concentración más alta probada (234 mM, aproximadamente 8 % p/v).

El aumento de la concentración de DMG solo aumentó la recuperación de adyuvante. Se observó una buena respuesta dependiente de la dosis y fue posible lograr una recuperación cercana al 100 % con DMG solo.

- 25 La coformulación del adyuvante con DMG y sacarosa redujo significativamente la cantidad de DMG requerida para lograr una recuperación cercana al 100 %.

Ejemplo 2

Métodos

- 5 El adyuvante de hidróxido de aluminio se obtuvo en Sigma (A8222) en forma de una solución de 13 mg/ml a pH 6,8. Inicialmente, se añadieron volúmenes de 50 µl del adyuvante de hidróxido de aluminio a 100 µl de volúmenes de sacarosa y/o un excipiente adicional diluido en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS) en pocillos de microplacas de fondo plano de 96 pocillos. Los excipientes adicionales fueron S-metil-L-metionina, MSM y TMG.
- 10 Los adyuvantes se congelaron a -20 °C. En la Tabla 2 a continuación se puede ver una lista de las concentraciones finales de sacarosa y el excipiente adicional antes de la congelación.

Después de aproximadamente 18 horas, las muestras que contenían Al(OH)₃ se descongelaron y se evaluaron los niveles de sedimento como se describe mediante el ensayo de aglomeración de adyuvantes en el Ejemplo 1.

15

Tabla 2

Excipiente adicional	Concentración de excipiente adicional (M)	Concentración de sacarosa (mM)
S-metil-L-metionina*	1	234
S-metil-L-metionina*	0,33	234
S-metil-L-metionina*	0,1	234
S-metil-L-metionina*	0	234
S-metil-L-metionina*	1	117
S-metil-L-metionina*	0,33	117
S-metil-L-metionina*	0,1	117
S-metil-L-metionina*	0	117
S-metil-L-metionina*	1	58
S-metil-L-metionina*	0,33	58
S-metil-L-metionina*	0,1	58
S-metil-L-metionina*	0	58
S-metil-L-metionina*	1	29
S-metil-L-metionina*	0,33	29
S-metil-L-metionina*	0,1	29
S-metil-L-metionina*	0	29
S-metil-L-metionina*	1	0
S-metil-L-metionina*	0,33	0
S-metil-L-metionina*	0,1	0
S-metil-L-metionina*	0	0
MSM*	0,53	234
MSM*	0,26	234
MSM*	0,13	234
MSM*	0,07	234
MSM*	0	234
MSM*	0,53	117
MSM*	0,26	117
MSM*	0,13	117
MSM*	0,07	117

ES 2 708 989 T3

Excipiente adicional	Concentración de excipiente adicional (M)	Concentración de sacarosa (mM)
MSM*	0	117
MSM*	0,53	58
MSM*	0,26	58
MSM*	0,13	58
MSM*	0,07	58
MSM*	0	58
MSM*	0,53	29
MSM*	0,26	29
MSM*	0,13	29
MSM*	0,07	29
MSM*	0	29
MSM*	0,53	0
MSM*	0,26	0
MSM*	0,13	0
MSM*	0,07	0
MSM*	0	0
TMG	1	234
TMG	0,33	234
TMG	0,1	234
TMG	0	234
TMG	1	117
TMG	0,33	117
TMG	0,1	117
TMG	0	117
TMG	1	58
TMG	0,33	58
TMG	0,1	58
TMG	0	58
TMG	1	29
TMG	0,33	29
TMG	0,1	29
TMG	0	29
TMG*	1	0
TMG*	0,33	0
TMG*	0,1	0
TMG*	0	0

* indica un ejemplo de referencia

Resultados y análisis

Los resultados de estos estudios se muestran en dos formas en las Figuras 3 y 4. En primer lugar, se muestran diagramas de dispersión XY simples y esto se complementa con gráficos de hoja 3D.

5 En ausencia de ambos, sacarosa y un excipiente adicional, solo se midió una recuperación de adyuvante del 30 %, lo que indica que se había producido una pérdida muy significativa en la estructura del adyuvante durante la congelación y descongelación (pérdida del ~70 %). El aumento de la concentración de sacarosa en la formulación aumentó la recuperación del adyuvante hasta un máximo de ~70 % en la concentración máxima probada (234 mM, aproximadamente 8 % p/v).

10 El aumento de la concentración del excipiente adicional solo (TMG y S-metil-L-metionina) aumentó la recuperación de adyuvante. En cada uno de estos casos, se observó una buena respuesta dependiente de la dosis y fue posible lograr una recuperación cercana al 100% con el excipiente adicional solo.

15 La coformulación del adyuvante con ambos, sacarosa y uno de los excipientes adicionales (TMG o S-metil-L-metionina) redujo significativamente la cantidad del excipiente adicional requerido para lograr una recuperación cercana al 100 %.

20 **Ejemplo 3**Métodos

25 El adyuvante de hidróxido de aluminio se obtuvo en Sigma (A8222) en forma de una solución de 13 mg/ml a pH 6,8. Se centrifugó un volumen de adyuvante para formar un sedimento que posteriormente se lavó en HEPES 40 mM + NaCl 25 mM a pH 7,9 (dos veces) y se resuspendió en la mitad del volumen original, dando como resultado una solución de aproximadamente 26 mg/ml. En cada vial se añadieron 75 µl de 26 mg/ml de solución de adyuvante y 225 µl de excipiente pertinente (ajustado en la concentración para tener en cuenta el volumen de adyuvante añadido) para igualar la concentración adecuada, con cada vial que contiene una concentración final de adyuvante de 6,5 mg/ml. En la Tabla 4 a continuación se expone una lista de las concentraciones finales de excipientes.

30 Las muestras se liofilizaron mediante el liofilizador VirTis Advantage, usando los ciclos de secado que se muestran en la Tabla 3 a continuación, con una duración de aproximadamente 3 días. Las muestras se congelaron a -40 °C durante 2 horas antes de que se aplicara un vacío, inicialmente

35 a 40 Pa (300 miliTorr) con una bomba Thermo Savant VLP (Thermofisher, Reino Unido). La temperatura del estante y el vacío se ajustaron durante todo el proceso y el condensador se mantuvo a -80 °C. La etapa 11 se extendió hasta que las muestras se taparon antes de liberar el vacío.

40 En la fase de secado primario, la temperatura del estante se redujo a -45 °C. La fase de secado secundario incluyó series de etapas de mantenimiento que aumentaron de temperatura hasta 30 °C hasta que se completó el secado. Las sondas registraron temperaturas de estante y temperaturas de condensador.

Tabla 3

Etapa	Temp. del estante (°C)	Tiempo (minutos)	Desnivel/Mantenimiento	Vacío (Pa) (miliTorr)
1	-45	15	H	-
2	-34	30	R	40 (300)
3	-34	1200	H	40 (300)
4	-20	120	H	40 (300)
5	-10	120	H	40 (300)
6	0	120	H	40 (300)
7	10	120	H	10,7 (80)
8	20	120	H	10,7 (80)
9	30	1255	H	10,7 (80)
10	30	905	H	10,7 (80)
11	4	1255	H	10,7 (80)

45

Ensayos de aglomeración de adyuvante

Los viales que contenían adyuvante liofilizado se reconstituyeron en 300 µl de agua purificada y se agitaron con formación en vórtice. La cantidad de aglomeración se evaluó tomando muestras de cada pocillo en micropipetas de 100 µl, permitiendo que el reasentamiento se produjera durante 90 minutos a temperatura ambiente y luego midiendo la altura del gel sedimentado como un porcentaje de la altura total de la solución en la pipeta. La altura del gel sedimentado como porcentaje de la altura total de la solución en la pipeta se expresó como % de volumen de gel. Cuanto mayor sea el % de volumen de gel, más estructuralmente intacto será el adyuvante.

10

Tabla 4

Excipiente adicional	Conc. de excipiente adicional (mM)	Conc. de sacarosa (mM)	% de volumen de gel
Ninguno*	0	500	100
Ninguno*	0	334	93,2
Ninguno*	0	167	47,3
Ninguno*	0	84,2	32,3
Ninguno*	0	1	14,7
Ninguno*	0	0	16,7
DMG	1	500	99,6
DMG	1	1	12,4
DMG	500	1	99,7
DMG	1	334	96,2
DMG	167	334	100
DMG	1	167	37,2
DMG	167	167	99,7
DMG	334	167	100
DMG	167	1	79,82
DMG	334	1	99,5
DMG	84	334	99,6
DMG	84	84	50,4
DMG	334	84	59,5
DMG	1	500	99,6
DMG	1	1	18,1
DMG	500	1	100
DMG	167	167	100
TMG	1	500	99,6
TMG	1	1	13,5
TMG	500	1	99,3
TMG	1	334	93,0
TMG	167	334	100
TMG	1	167	39,8
TMG	167	167	99,6
TMG	334	167	100
TMG	167	1	60,9

ES 2 708 989 T3

Excipiente adicional	Conc. de excipiente adicional (mM)	Conc. de sacarosa (mM)	% de volumen de gel
TMG	334	1	84,7
TMG	84	334	90,4
TMG	84	84	51,2
TMG	334	84	94,1
TMG	1	500	100
TMG	1	1	14,1
TMG	500	1	99,5
TMG	167	167	100
SMM*	1	500	100
SMM*	1	1	13,7
SMM*	500	1	100
SMM*	1	334	95,4
SMM*	167	334	98,1
SMM*	1	167	40,0
SMM*	167	167	100
SMM*	334	167	100
SMM*	167	1	98,0
SMM*	334	1	100
SMM*	84	334	100
SMM*	84	84	99,6
SMM*	334	84	99,2
SMM*	1	500	98,2
SMM*	1	1	14,9
SMM*	500	1	100
SMM*	167	167	100
Sarcosina*	1	500	98,1
Sarcosina*	1	1	13,8
Sarcosina*	500	1	100
Sarcosina*	1	334	91,3
Sarcosina*	167	334	98,2
Sarcosina*	1	167	40,6
Sarcosina*	167	167	98,5
Sarcosina*	334	167	100
Sarcosina*	167	1	50,7
Sarcosina*	334	1	100
Sarcosina*	84	334	97,2
Sarcosina*	84	84	65,9

Excipiente adicional	Conc. de excipiente adicional (mM)	Conc. de sacarosa (mM)	% de volumen de gel
Sarcosina*	334	84	100
Sarcosina*	1	500	98,1
Sarcosina*	1	1	14,1
Sarcosina*	500	1	100
Sarcosina*	167	167	98,4

* indica un ejemplo de referencia.

Resultados y análisis

5 Los resultados se exponen en la Tabla 4 anterior y gráficamente en la Figura 5. Estos confirman que la estructura del adyuvante se puede mantener después de la liofilización de las soluciones de adyuvante en presencia de un intervalo de concentraciones de (i) DMG, TMG, S-metil metionina o sarcosina y (ii) sacarosa. En general, la calidad de la torta es mejor para concentraciones más bajas del excipiente adicional y concentraciones más altas de sacarosa.

Ejemplo 4

10

Materiales y equipamiento

Manitol:	Sigma	Lote n.º: 077K0166
DMG:	Sigma	Lote n.º 077K0166
TMG	Sigma	Lote n.º 049K1529
SMM	Sigma	Lote n.º 001425374
Sarcosina	Sigma	Lote n.º 078K3727
Gel de hidróxido de aluminio	Sigma	Lote n.º 018K0761
Liofilizador Virtis Advantage Plus:	Virtis	EQP n.º 084
Agua purificada:	Sigma	Lote n.º RNBB2958
Micropipetas (tubos capilares):	Blaubrand,	Lot n.º 7091 44
Viales de liofilización:	Adelphi 2 ml VCDIN2R	
Tapones:	Adelphi FDW13 13 mm	

Métodos

15

Teniendo en cuenta los 75 µl de adyuvante añadido por 300 µl de vial de liofilización (1/4 de volumen, por lo tanto, un 25 % más concentrado), se crearon las siguientes mezclas de excipientes en el tampón HEPES como mezclas madres de 10 ml:

20

Tabla 5

	Manitol [M]				
	0,548	0,274	0,137	0,069	0 %
Excipiente [mM]	500				
	250				
	125				
	62,5				
	31,25				
	15,63				
	0				

25 A cada vial se añadieron 75 µl de 26 mg/ml de adyuvante de hidróxido de aluminio (que se preparó centrifugando 13 mg/ml de gel de hidróxido de aluminio y resuspendiendo el sedimento en la mitad del volumen original) y 225 µl de la mezcla de excipientes adecuada, como se enumera anteriormente. Los viales se taparon antes de colocarlos en el liofilizador VirTis Advantage, usando los ciclos de secado que se muestran en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6

Tabla 6

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Vacío Pa (MiliTorr)
1	-40	45	66,7 (500)
2	-36	600	26,7 (200)
3	-20	120	40 (300)
4	-10	120	40 (300)
5	0	120	40 (300)
6	10	120	10,7 (80)
7	20	120	10,7 (80)
8	30	1255	10,7 (80)
9	4	1255	10,7 (80)

- 5 Después de liofilizar, los viales se taparon al vacío, se recubrieron y se tomaron fotografías. La aglomeración de adyuvante se evaluó como se expone en el Ejemplo 3.

Resultados y análisis

- 10 Los resultados se exponen en las Tablas 7 a 10 a continuación.

Tabla 7A

Manitol [M]	0,548	0,548	0,548	0,548	0,548	0,548	0,548
DMG [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0*
% de altura de gel	100	100	100	100	98	97	98,5

Tabla 7B

Manitol [M]	0,274	0,274	0,274	0,274	0,274	0,274	0,274
DMG [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0*
% de altura de gel	100	100	100	98	77,5	96	50

15

Tabla 7C

Manitol [M]	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137
DMG [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0*
% de altura de gel	98	100	96	73,3	43,75	46,2	32,5

Tabla 7D

Manitol [M]	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069
DMG [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0*
% de altura de gel	100	100	90	28,6	26,2	21,2	16,7

20

Tabla 7E

Manitol [M]	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041
DMG [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0*
% de altura de gel	99	99	90	42,5	27,0	18,8	12,5

Tabla 7F

Manitol [M]	0,0206	0,0206	0,0206	0,0206	0,0206	0,0206	0,0206
DMG [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0*
% de altura de gel	99	98	95	41,5	25,0	14,0	12,5

Tabla 7G*

Manitol M	0	0	0	0	0	0	0
DMG [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0
% de altura de gel	100	97	80	31,6	18,6	13,6	11,8

5

Tabla 8A

Manitol M	0,548	0,548	0,548	0,548	0,548	0,548	0,548
TMG [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0*
% de altura de gel	100	100	100	100	97	94	92

Tabla 8B

Manitol M	0,274	0,274	0,274	0,274	0,274	0,274	0,274
TMG [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0*
% de altura de gel	100	100	100	100	88,9	80	45

Tabla 8C

Manitol M	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137
TMG [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0*
% de altura de gel	100	98	87,5	50	50	38,6	35,7

10

Tabla 8D

Manitol M	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069
TMG [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0*
% de altura de gel	99	98	90	50	25	15,8	11,6

Tabla 8E

Manitol M	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041
TMG [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0*
% de altura de gel	100	100	98	50	25,0	15,8	11,6

15

Tabla 8F

Manitol M	0,0206	0,0206	0,0206	0,0206	0,0206	0,0206	0,0206
TMG [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0*
% de altura de gel	98	96	80	44,0	20,0	16,6	13,5

Tabla 8G*

Manitol M	0	0	0	0	0	0	0
TMG [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0
% de altura de gel	98	90	50	27,7	15,5	10,7	9,9

ES 2 708 989 T3

Tabla 9A*

Manitol M	0,548	0,548	0,548	0,548	0,548	0,548	0,548
SMM [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0
% de altura de gel	100	100	100	98	95	100	95,0

Tabla 9B*

Manitol M	0,274	0,274	0,274	0,274	0,274	0,274	0,274
SMM [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0
% de altura de gel	100	100	100	100	100	90	48

5

Tabla 9C*

Manitol M	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137
SMM [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0
% de altura de gel	98	100	98	98	62,5	50	31,9

Tabla 9D*

Manitol M	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069
SMM [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0
% de altura de gel	100	97	100	88,2	27,5	23,4	18,75

Tabla 9E*

Manitol M	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041
SMM [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0
% de altura de gel	100	100	97	97	78,6	24,7	15,7

10

Tabla 9F*

Manitol M	0,0206	0,0206	0,0206	0,0206	0,0206	0,0206	0,0206
SMM [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0
% de altura de gel	98	98	90	98	45	23,8	12,5

Tabla 9G*

Manitol M	0	0	0	0	0	0	0
SMM [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0
% de altura de gel	100	100	100	96	34,4	26,2	11,1

15

Tabla 10A*

Manitol M	0,548	0,548	0,548	0,548	0,548	0,548	0,548
Sarc. [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0
% de altura de gel	100	100	97	88	97	88	89

Tabla 10B*

Manitol M	0,274	0,274	0,274	0,274	0,274	0,274	0,274
Sarc. [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0
% de altura de gel	100	100	100	98	87,5	88,9	39,8

Tabla 10C*

Manitol M	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137
Sarc. [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0
% de altura de gel	98	100	61,2	40	35,7	33,7	30,8

Tabla 10D*

Manitol M	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069
Sarc. [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0
% de altura de gel	100	100	98	34,1	22,7	21,9	20,4

5

Tabla 10E*

Manitol M	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041
Sarc. [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0
% de altura de gel	100	100	98	28,6	20	14,8	13,1

Tabla 10F*

Manitol M	0,0206	0,0206	0,0206	0,0206	0,0206	0,0206	0,0206
Sarc. [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0
% de altura de gel	97	97	80	38	20	13,5	12,6

Tabla 10G*

Manitol M	0	0	0	0	0	0	0
Sarc. [mM]	500	250	125	62,5	31,25	15,625	0
% de altura de gel	100	100	90	37,5	17,7	12,8	11,1
* indica un ejemplo de referencia.							

10

Estos resultados muestran que la presencia de DMG, TMG, SMM y sarcosina permite reducir la concentración de azúcares sin reducir la protección del adyuvante. Esto demuestra el claro papel de los excipientes en la estabilización adyuvante.

15

Ejemplo 5

Materiales y equipamiento

Manitol:	Sigma	Lot n.º: 077K0166
DMG:	Sigma	Lote n.º 077K0166
TMG	Sigma	Lot n.º 049K1529
SMM	Sigma	Lote n.º 001425374
Sarcosina	Sigma	Lote n.º 078K3727
Gel de hidróxido de aluminio	Sigma	Lote n.º 018K0761
Liofilizador Virtis Advantage Plus:	Virtis	EQP n.º 084
Agua purificada:	Sigma	Lote n.º RNBB2958
Micropipetas (tubos capilares):	Blaubrand,	Lot n.º 7091 44
Viales de liofilización:	Adelphi 2 ml VCDIN2R	
Tapones:	Adelphi FDW13 13 mm	

20 Métodos

Teniendo en cuenta los 75 µl de adyuvante añadido por 300 µl de vial de liofilización (1/4 de volumen, por lo tanto, un 25 % más concentrado), se crearon las siguientes mezclas de excipientes en el tampón HEPES en mezclas madres de 10 ml:

Tabla 11

	Manitol [M]					0
	0,767	0,657	0,548	0,438	0,329	
Excipiente [M]	1,4					
	1,2					
	1,0					
	0,8					
	0,6					
	0					

- 5 A cada vial se añadieron 75 µl de 26 mg/ml de adyuvante de hidróxido de aluminio (que se preparó centrifugando 13 mg/ml de gel de hidróxido de aluminio y resuspendiendo el sedimento en la mitad del volumen original) y 225 µl de la mezcla de excipientes adecuada, como se enumera anteriormente. A continuación los viales se taparon antes de colocarlos en el liofilizador y se ejecutaron en el ciclo expuesto en la Tabla 12.

Tabla 12

Etap	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Vacío Pa (MiliTorr)
1	-40	45	
2	-36	600	26,7 (200)
3	-20	120	40 (300)
4	-10	120	40 (300)
5	0	120	40 (300)
6	10	120	10,7 (80)
7	20	120	10,7 (80)
8	30	1255	10,7 (80)
9	4	1255	10,7 (80)

- 10 Después de liofilizar, los viales se taparon al vacío, se recubrieron y se tomaron fotografías. La aglomeración de adyuvante se evaluó como se expone en el Ejemplo 3.

Resultados y análisis

- 15 Los resultados se exponen en las Tablas 13 y 14 a continuación.

Tabla 13

Manitol [M]	Tipo de excipiente/Concentración [mM]	% de protección
0,767	DMG 1,4 M	100
	1,2 M	100
	1,0 M	100
	0,8 M	100
	0,6 M	100
	0 M*	86
0,657	DMG 1,4 M	100
	1,2 M	100

ES 2 708 989 T3

Manitol [M]	Tipo de excipiente/Concentración [mM]	% de protección
	1,0 M	100
	0,8 M	100
	0,6 M	100
	0 M*	75
0,548	DMG 1,4 M	100
	1,2 M	100
	1,0 M	100
	0,8 M	100
	0,6 M	100
	0 M*	63
0,438	DMG 1,4 M	100
	1,2 M	100
	1,0 M	96
	0,8 M	100
	0,6 M	100
	0 M*	50
0,329	DMG 1,4 M	100
	1,2 M	100
	1,0 M	100
	0,8 M	96
	0,6 M	100
	0 M*	23
0*	DMG 1,4 M	100
	1,2 M	100
	1,0 M	100
	0,8 M	96
	0,6 M	96
	0 M*	11
0,767	TMG 1,4 M	100
	1,2 M	100
	1,0 M	100
	0,8 M	100
	0,6 M	100
	0 M*	90
0,657	TMG 1,4 M	100
	1,2 M	100
	1,0 M	100
	0,8 M	98

Manitol [M]	Tipo de excipiente/Concentración [mM]	% de protección
	0,6 M	100
	0 M*	80
0,548	TMG 1,4 M	100
	1,2 M	100
	1,0 M	100
	0,8 M	100
	0,6 M	100
	0 M*	70
0,438	TMG 1,4 M	100
	1,2 M	100
	1,0 M	100
	0,8 M	100
	0,6 M	100
	0 M*	50
0,329	TMG 1,4 M	100
	1,2 M	100
	1,0 M	100
	0,8 M	96
	0,6 M	100
	0 M*	50
0*	TMG 1,4 M	100
	1,2 M	100
	1,0 M	100
	0,8 M	100
	0,6 M	96
	0 M*	14

Tabla 14*

Manitol [M]	Tipo de excipiente/Concentración [mM]	% de protección
0,767	SMM 1,4 M	100
	1,2 M	100
	1,0 M	98
	0,8 M	98
	0,6 M	98
	0 M	82
0,657	SMM 1,4 M	100
	1,2 M	98
	1,0 M	98

Manitol [M]	Tipo de excipiente/Concentración [mM]	% de protección
	0,8 M	98
	0,6 M	100
	0 M	75
0,548	SMM 1,4 M	100
	1,2 M	100
	1,0 M	100
	0,8 M	100
	0,6 M	100
	0 M	68
0,438	SMM 1,4 M	100
	1,2 M	100
	1,0 M	100
	0,8 M	100
	0,6 M	98
	0 M	52
0,329	SMM 1,4 M	100
	1,2 M	100
	1,0 M	100
	0,8 M	98
	0,6 M	100
	0 M	46
0	SMM 1,4 M	100
	1,2 M	100
	1,0 M	100
	0,8 M	100
	0,6 M	95
	0 M	12

* indica un ejemplo de referencia.

Estos resultados muestran que la presencia de DMG, TMG y SMM permite reducir la concentración de azúcares sin reducir la protección del adyuvante. Esto demuestra el claro papel de los excipientes en la estabilización adyuvante.

5 Ejemplo 6

Introducción

10 La albúmina de suero bovino (ASB) se usa comúnmente como modelo en experimentos en los que, por ejemplo, se debe medir la adsorción de proteínas en un adyuvante.

Materiales y equipamiento

ABS:
Alhidrogel: 2 %
Manitol:

Sigma P5369
Brenntag
Sigma

Lot 058K6061
Lote 4420
Lot n.º: 077K0166

ES 2 708 989 T3

DMG:	Sigma	Lote n.º 077K0166
TMG:	Sigma	Lote n.º 049K1529
SMM:	Sigma,	Lote n.º 001425374
DPBS:	Sigma	RNBB1286
Liofilizador Virtis Advantage Plus:	Virtis	EQP n.º 084
Agua purificada:	Sigma	Lote n.º RNBB2958
Viales de liofilización:	Adelphi 2 ml VCDIN2R	
Tapones:	Adelphi FDW13 13 mm	
Congelador a -20 °C:	Stabilitech EQP n.º	
Placa ELISA Nunc de 96 pocillos Reactivo de Bradford:	Sigma B6916-500ML	Lote 080M4359
Lector de placas BioTek:	Stabilitech EQP: 027	

Adsorción de proteínas

- 5 Se añadió alhidrogel (suministrado a una reserva del 2 % (p/v)) a PBS que contenía ASB para igualar un volumen final de 10 ml con una concentración de alhidrogel al 0,52 % y 200 µg/ml de ASB. La etapa de adsorción de proteínas se incubó agitándola suavemente a temperatura ambiente antes de colocarla durante una noche a +4 °C.

Las siguientes mezclas de excipientes se prepararon en volúmenes de 5 ml:

- 10
- Manitol (24 %) 1,315 M
 - (24 %) 1,315 M + DMG 1,6 M
 - (24 %) 1,315 M + TMG 1,6 M
 - (24 %) 1,315 M + SMM 1,6 M
- 15
- Manitol (20 %) 1,096 M + DMG 1,2 M
 - (20 %) 1,096 M + TMG 1,2 M
 - (20 %) 1,096 M + SMM 1,2 M
 - Manitol (16 %) 0,877 M + DMG 0,8 M
 - (16 %) 0,877 M + TMG 0,8 M
 - (16 %) 0,877 M + SMM 0,8 M
- 20
- PBS

Procesamiento adyuvante-excipiente

- 25 El adyuvante se mezcló con la concentración de excipiente en una relación de 1:1 (2 ml + 2 ml) para crear la concentración media de excipientes anterior, alhidrogel al 0,26 % y 100 µg/ml de ASB. Esto se incubó a +4 °C durante 12 horas antes de dividirse en volúmenes de 300 µl que (a) se congelaron (-80 °C), (b) se liofilizaron como se expone en la Tabla 15 a continuación o (c) se mantuvieron a +4 °C como líquido.

- 30 Los blancos de volúmenes equivalentes se produjeron y procesaron como se analizó, en los que no se incluyó proteína como blancos para el ensayo de proteínas.

Tabla 15

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Vacío Pa (MiliTorr)
1	-40	45	
2	-36	600	26,7 (200)
3	-20	120	40 (300)
4	-10	120	40 (300)
5	0	120	40 (300)
6	10	120	10,7 (80)
7	20	120	10,7 (80)
8	30	1255	10,7 (80)
9	4	1255	10,7 (80)

- 35 Después de liofilizar, los viales se taparon al vacío, se recubrieron y se tomaron fotografías y se calificaron las tortas según la calidad de la torta y se calificó la calidad de la torta como se describe en el Ejemplo 3.

Los viales líquidos, congelados y liofilizados se colocaron luego a temperatura ambiente para equilibrar/descongelar, mientras que los viales liofilizados se reconstituyeron en 300 µl de agua purificada y se agitaron con formación de vórtice hasta que se observó una reconstitución completa.

- 5 Cada uno de los volúmenes de 300 µl se pulsó en la microcentrífuga durante 1 minuto para sedimentar el adyuvante, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en volúmenes iguales de PBS. Este procedimiento se repitió 3 veces para eliminar completamente los excipientes residuales del adyuvante.

Ensayo de proteínas (Bradford)

- 10 Cada una de las combinaciones de excipientes se ejecutó por duplicado con un blanco de contrapartida duplicado (es decir, sin proteína). Las muestras líquidas, liofilizadas y congeladas se procesaron en placas separadas. Para estandarizar las concentraciones de proteína, cada placa se realizó con una curva convencional que comenzó con ABS a 200 µg/ml diluida en serie hasta 6,25 µg/ml. Se añadió un volumen de 50 µl de muestra de adyuvante a cada pocillo antes de añadir 125 µl de solución de Bradford (equilibrada a temperatura ambiente). Las placas se transfirieron al lector de placas que se expuso en el modo de agitación de la placa (para mantener el adyuvante en suspensión) durante 5 minutos antes de que se leyera cada placa a una absorbancia a 595 nm.

Resultados

- 20 Para cada placa se produjeron curvas convencionales (con blancos restados) y esas curvas convencionales (con la ecuación $y = mx + c$) se usaron para determinar las concentraciones de proteínas de las muestras de adyuvantes con sus blancos respectivos también restados. Los datos se representaron como la concentración de proteína total de la muestra de adyuvante/ml y también como un porcentaje del control de PBS.

- 25 Los resultados se exponen en las Tablas 16 a 18 a continuación y en las Figuras 6 y 7.

Tabla 16

Excip [M]	DMG 0,8 M + Man. 0,66 M	TMG 0,8 M + Man. 0,66 M	SMM 0,8 M + Man. 0,66 M	Man. 0,66 M*
% ABS (de control de PBS)	99,49	98,12	96,76	100,00

Tabla 17

Excip [M]	DMG 0,6 M + Man. 0,548 M	TMG 0,6 M + Man. 0,548 M	SMM 0,6 M + Man. 0,548 M*
% ABS (de control de PBS)	97,27	101,877	100,68

Tabla 18

Excip [M]	DMG 0,4 M + Man. 0,438 M	TMG 0,4 M + Man. 0,438 M	SMM 0,4 M + Man. 0,438 M*
% ABS (de control de PBS)	97,088	94,37	95,39
* indica un ejemplo de referencia.			

Análisis

- 35 Estas concentraciones de manitol y DMG, TMG y SMM dieron como resultado una conservación estructural casi completa de la estructura adyuvante.

- 40 Los resultados de la proteína total demuestran que los niveles de ASB adsorbidos al adyuvante fueron comparables en todos los intervalos de excipiente de manitol, y de hecho al manitol solo (0,66 M/12 %) y PBS. Esto sugiere que no hubo elución de la proteína causada por los excipientes cuando se introdujo en el alhidrogel pre-adsorbido. Este fue también el caso de PBS y manitol. La retención de líquidos, la liofilización y los incidentes de congelación y descongelación no agravaron ninguna elución.

- 45 Este experimento muestra que la proteína aún está adsorbida al adyuvante en condiciones en las que la estructura del adyuvante se conserva durante la liofilización.

Ejemplo 7Introducción

- 5 Este experimento compara una base de manitol con DMG, TMG y SMM en niveles que previamente se ha demostrado que protegen la estructura adyuvante. Compara la antigenicidad del anticuerpo unido al alumbre tanto cuando el anticuerpo de alumbre se ha mantenido a 4 °C como cuando se ha congelado y descongelado, usando una transferencia puntual para probar la actividad del anticuerpo en ambos métodos de almacenamiento.

10 Materiales*Producto químico*

	Proveedor	Código de producto	Lote n.º
PBS x 10		-	-
Tween 20	Sigma	P1379	-
Leche desnatada en polvo	Marvel	-	-
Alhidrogel	Brenntag	-	4420
Cromógeno TMB	Invitrogen	SB02	727643282A
mAB de ratón	Serotec	8437	5208x220610
HRP antiratón	Sigma	A0412	077K6008
Manitol	Sigma	M1902	077K0166
DMG	Sigma	D1156	077K1856U
TMG	Sigma	B2629	049K1529
SMM	Sigma	12209121	0001423374

15 *Otros*

	Proveedor	Código de producto	Lote n.º
Membrana de nitrocelulosa	Sigma	N8267	3110
Placa de Petri	Fisher	FB51504	264541

Equipo

	Fabricante	Equipamiento n.º
Balancín	Stuart Scientific	EQP n.º 091
Balanza	Sartorius	EQP n.º 089
Congelador de 80 °C serie 900 de Forma	Thermofisher	EQP n.º 015
Escáner	Cannon	-

20

Métodos

25 El anticuerpo de ratón adsorbido en alumbre se congeló y descongeló y se mantuvo a 4 °C en presencia de diversos excipientes. Esto se ensayó usando una transferencia puntual para ver si el anticuerpo de ratón había conservado su antigenicidad.

30 La solución de alhidrogel al 2 % se diluyó con PBS al 0,52 % y el anticuerpo de ratón se añadió a una concentración de 200 µg/ml. Esto se dejó mezclar durante una hora a temperatura ambiente con agitación y luego se puso a 4 °C durante una noche. La solución de alumbre-anticuerpo se diluyó 1:1 con soluciones de excipientes para dar las concentraciones finales de excipientes como se enumera a continuación:

- Manitol 0,657M*

- Manitol 0,657M + DMG 0,8 M

- Manitol 0,657M + TMG 0,8 M

5 - Manitol 0,657M + SMM 0,8 M*

- PBS*

* = Ejemplo de referencia

10

Estas soluciones se dividieron luego en dos partes alícuotas. Uno de cada excipiente se mantuvo a 4 °C, el otro se almacenó a -80 °C hasta que se requirió.

Transferencia puntual de la actividad del anticuerpo de ratón conservada

15

Se cortó una membrana de nitrocelulosa al tamaño requerido y se aplicaron 2 µl de muestras como puntos. Esto se dejó secar y luego se incubó en 10 ml de PBS + 0,05 % de Tween 20 + 5 % de leche durante 1 hora a temperatura ambiente en un balancín. A continuación se eliminó esta solución y luego se incubó la membrana en 10 ml de HRP anti-ratón (peroxidasa de rábano picante) diluida a 1:5000 en PBS + Tween 20 al 0,05 % + 5 % de leche durante 1 hora a temperatura ambiente en un balancín. Las membranas se lavaron luego 3 veces durante 10 minutos con PBS + Tween 20 al 0,05 %. Las membranas se secaron sobre papel de seda para eliminar el exceso de tampón y luego se pusieron 10 ml de TMB (tetrametilbencidina) en la membrana durante 5 minutos. Luego se secó el TMB y se exploró el color de transferencia.

20

Resultados

La Figura 8 (La Tabla 19 muestra el diseño de las muestras probadas en la Figura 8) muestra que tanto las muestras líquidas (Figura 8A) como las congeladas y descongeladas (Figura 8B), todas las muestras que no contienen anticuerpos son negativas como se esperaba y el control positivo de anticuerpos solo es muy positivo. En las muestras líquidas todos los puntos son similares a las mismas diluciones. Las muestras congeladas son menos consistentes, especialmente entre las muestras en el excipiente y la muestra de control de PBS. La muestra de PBS es más débil en la dilución 1:500 que las muestras en los diferentes excipientes.

30

La Figura 9 (La Tabla 20 muestra el diseño de las muestras probadas en la Figura 9) muestra resultados consistentes con esto. Todos los controles negativos sin anticuerpo son negativos, incluidos los controles solo con excipientes que muestran que los excipientes no interfieren con el ensayo. Las muestras de PBS son nuevamente más débiles que las muestras líquidas cuando están congeladas, especialmente cuando se comparan con muestras en excipiente a 1:300 y 1:500.

35

40

Tabla 19: Disposición de las muestras probadas en la Figura 7

1. Alumbre al 0,52 % solamente	2. mAb de ratón 50ug/ml 1:100	3. mAb de ratón 50ug/ml 1:500
4. mAb de ratón-manitol al 12 %-alumbre al 0,26 %	5. mAb de ratón-manitol al 12 %-alumbre al 0,26 % 1:100	6. mAb de ratón-manitol al 12 %-alumbre al 0,26 % 1:500
7. mAb de ratón-manitol al 12 %-DMG 0,8 M-alumbre al 0,26 %	8. mAb de ratón-manitol al 12 %-DMG 0,8 M-alumbre al 0,26 % 1:100	9. mAb de ratón-manitol al 12 %-DMG 0,8 M-alumbre al 0,26 % 1:500
10. mAb de ratón-manitol al 12 %-TMG 0,8 M-alumbre al 0,26 %	11. mAb de ratón-manitol al 12 %-TMG 0,8 M-alumbre al 0,26 % 1:100	12. mAb de ratón-manitol al 12 %-TMG 0,8 M-alumbre al 0,26 % 1:500
13. mAb de ratón-manitol al 12 %-Vit U 0,8 M alumbre al 0,26 %	14. mAb de ratón-manitol al 12 %-Vit U 0,8 M alumbre al 0,26 % 1:100	15. mAb de ratón-manitol al 12 %-Vit U 0,8 M alumbre al 0,26 % 1:500
16. mAb de ratón-PBS-alumbre al 0,26 %	17. mAb de ratón-PBS-alumbre al 0,26 % 1:100	18. mAb de ratón-PBS-alumbre al 0,26 % 1:500

Tabla 20: Disposición de las muestras probadas en la Figura 8

1. Alumbre al 0,52 % solamente	2. mAb de ratón 50ug/ml	3. manitol al 12 %-Vit U 0,8 M alumbre al 0,26 %
4. mAb de ratón-manitol al 12 %-alumbre al 0,26 % 1:100	5. mAb de ratón-manitol al 12 %-alumbre al 0,26 % 1:300	6. mAb de ratón-manitol al 12 %-alumbre al 0,26 % 1:500

ES 2 708 989 T3

7. mAb de ratón-manitol al 12 %-DMG 0,8 M-alumbre al 0,26 % 1:100	8. mAb de ratón-manitol al 12 %-DMG 0,8 M-alumbre al 0,26 % 1:300	9. mAb de ratón-manitol al 12 %-DMG 0,8 M-alumbre al 0,26 % 1:500
10. mAb de ratón-manitol al 12 %-TMG 0,8 M-alumbre al 0,26 % 1:100	11. mAb de ratón-manitol al 12 %-TMG 0,8 M-alumbre al 0,26 % 1:300	12. mAb de ratón-manitol al 12 %-TMG 0,8 M-alumbre al 0,26 % 1:500
13. mAb de ratón-manitol al 12 %-Vit U 0,8 M alumbre al 0,26 % 1:100	14. mAb de ratón-manitol al 12 %-Vit U 0,8 M alumbre al 0,26 % 1:100	15. mAb de ratón-manitol al 12 %-Vit U 0,8 M alumbre al 0,26 % 1:500
16. mAb de ratón-PBS-alumbre al 0,26 % 1:100	17. mAb de ratón-PBS-alumbre al 0,26 % 1:300	18. mAb de ratón-PBS-alumbre al 0,26 % 1:500
19. Manitol al 12 %-alumbre al 0,26 %	20. Manitol al 12 %-DMG 0,8 M-alumbre al 0,26 %	21. Manitol al 12 %-TMG 0,8 M-alumbre al 0,26 %

Conclusión

- 5 Ambos conjuntos de resultados muestran resultados positivos más débiles para las muestras de PBS solo en comparación con las muestras que contienen excipientes cuando se congelan. Esto muestra que los excipientes ofrecen protección al anticuerpo con alumbre cuando se comparan con el anticuerpo con alumbre solo cuando las muestras se congelan y se descongelan, ya que el anticuerpo conserva su antigenicidad de manera más eficiente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para conservar un adyuvante de sal de aluminio durante la congelación o liofilización que comprende congelar o liofilizar una suspensión o solución acuosa que comprende:
- 5 (a) un adyuvante de sal de aluminio;
 (b) una N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma;
 y
 (c) uno o más azúcares.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la suspensión o solución acuosa comprende al menos un antígeno.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina es N,N-dimetilglicina o N,N,N-trimetilglicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el adyuvante de sal de aluminio es fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.
- 20 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el antígeno o cada antígeno se proporciona adsorbido en el adyuvante.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de la N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma es de al menos
 25 0,1 M.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
- 30 (i) se usa un azúcar; o
 (ii) se usa un azúcar y (a) el azúcar es sacarosa, la concentración de sacarosa es de 0,01 a 0,5 M o de 0,01 a 0,2 M y la concentración de la N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma es de 0,2 a 5 M, o (b) el azúcar es sacarosa, la concentración de sacarosa es de 0,01 a 0,5 M o de 0,01 a 0,2 M y la concentración de la N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma es de 0,2 a 2 M, o (c) el azúcar es manitol, la concentración de manitol es
 35 de 0,2 a 0,8 M y la concentración de la N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma es de 0,5 a 1 M, o (d) el azúcar es sacarosa y la concentración de sacarosa es de 0,01 a 0,7 M o de 0,01 a 0,6 M o de 0,01 a 0,5 M.
- 40 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que:
- (i) se usan dos o más azúcares; o
 (ii) se usan dos o más azúcares y (a) la sacarosa está presente con otro azúcar y el otro azúcar es rafinosa, estaquirosa o un alcohol de azúcar, o (b) la sacarosa está presente con otro azúcar y el otro azúcar es rafinosa.
- 45 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la suspensión o solución (a) se liofiliza, o (b) se liofiliza para formar una matriz sólida amorfa.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que se forma una matriz sólida amorfa seca y la matriz sólida se proporciona en forma de un polvo en un vial, ampolla o jeringa sellado.
- 50 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que (a) la torta resultante se muele para formar un polvo y el polvo se proporciona en un vial, ampolla o jeringa sellado, o (b) la matriz sólida forma parte del comprimido o cápsula.
- 55 12. Uso de un excipiente que comprende (i) una N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina como se define en la reivindicación 1 o 3 o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma y (ii) uno o más azúcares, para conservar un adyuvante de sal de aluminio durante la congelación o liofilización.
- 60 13. Una composición de vacuna que comprende:
- un adyuvante de sal de aluminio como se define en la reivindicación 1 o 4;
 - uno o más antígenos;
 - una N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina como se define en la reivindicación 1 o 3 o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma; y
 65 - uno o más azúcares.

14. Una composición de vacuna que puede obtenerse mediante un método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11.

5 15. Uso de un excipiente que comprende (i) una N,N-di(alquilo C₁₋₆)- o N,N,N-tri(alquilo C₁₋₆)-glicina como se define en la reivindicación 1 o 3 o una sal o éster fisiológicamente aceptable de la misma y (ii) uno o más azúcares, como agente de resuspensión para una composición de vacuna como se define en las reivindicaciones 13 o 14.

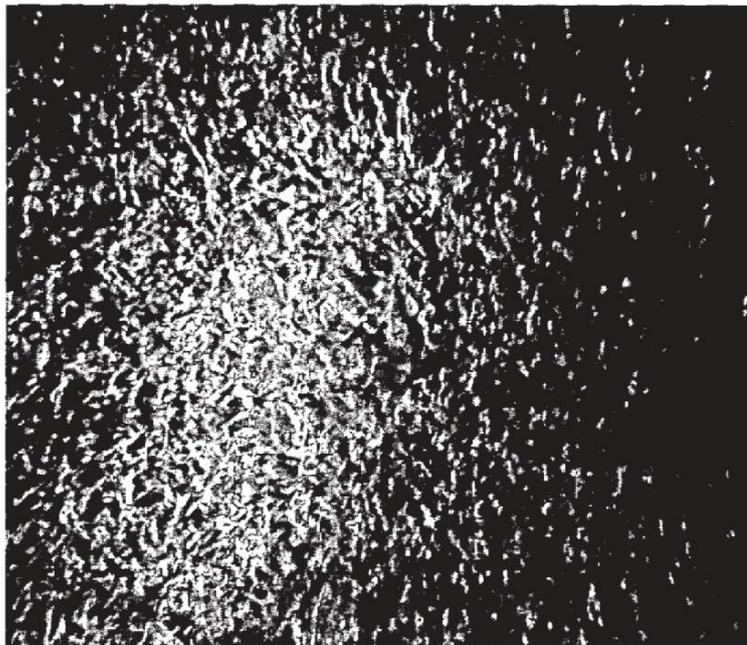
Figura 1

A



Adyuvante normal

B



Daño por congelación

Figura 2

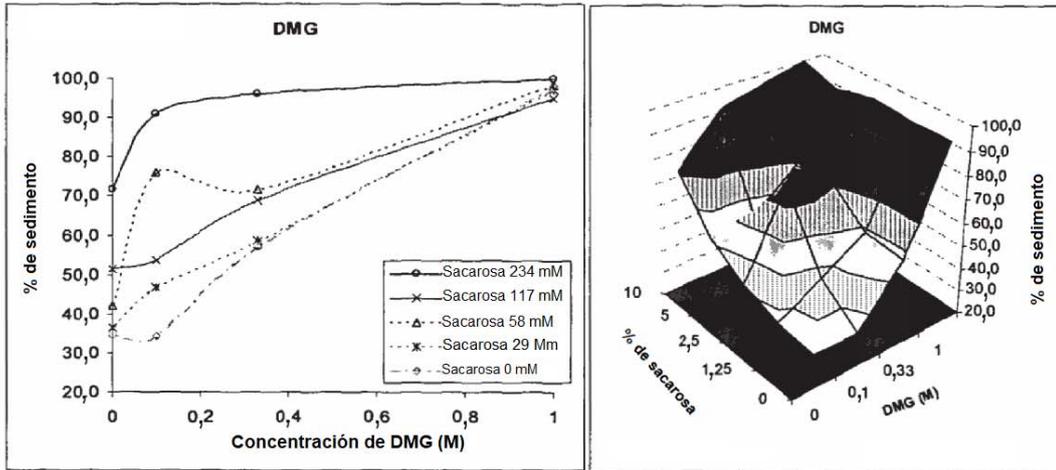


Figura 3

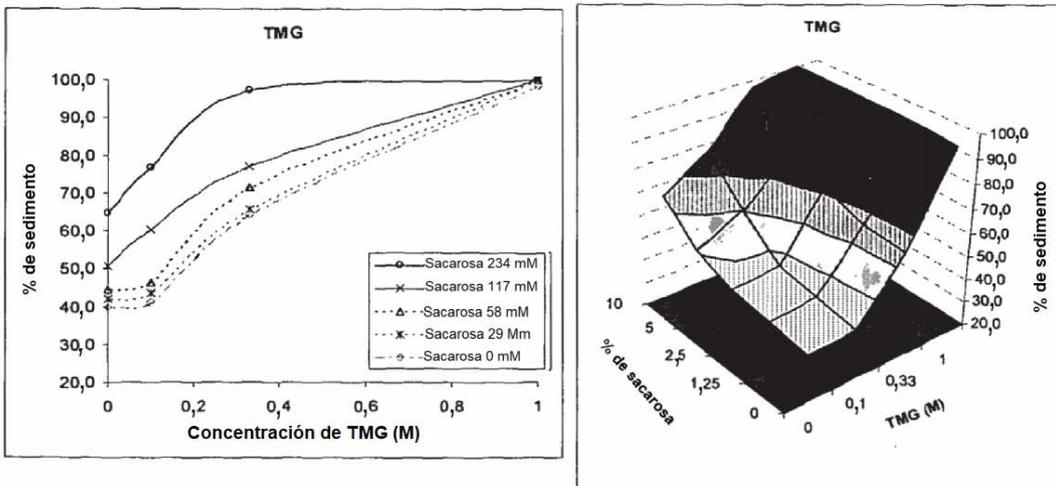


Figura 4

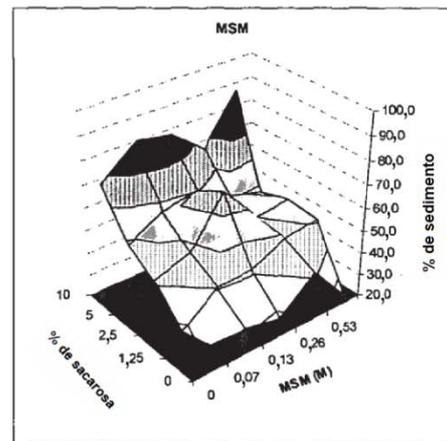
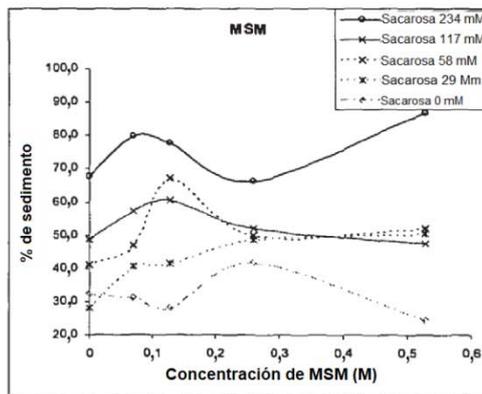
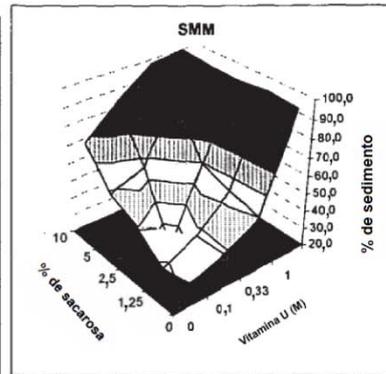
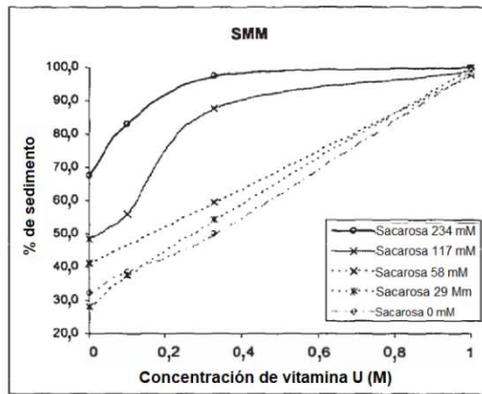


Figura 5

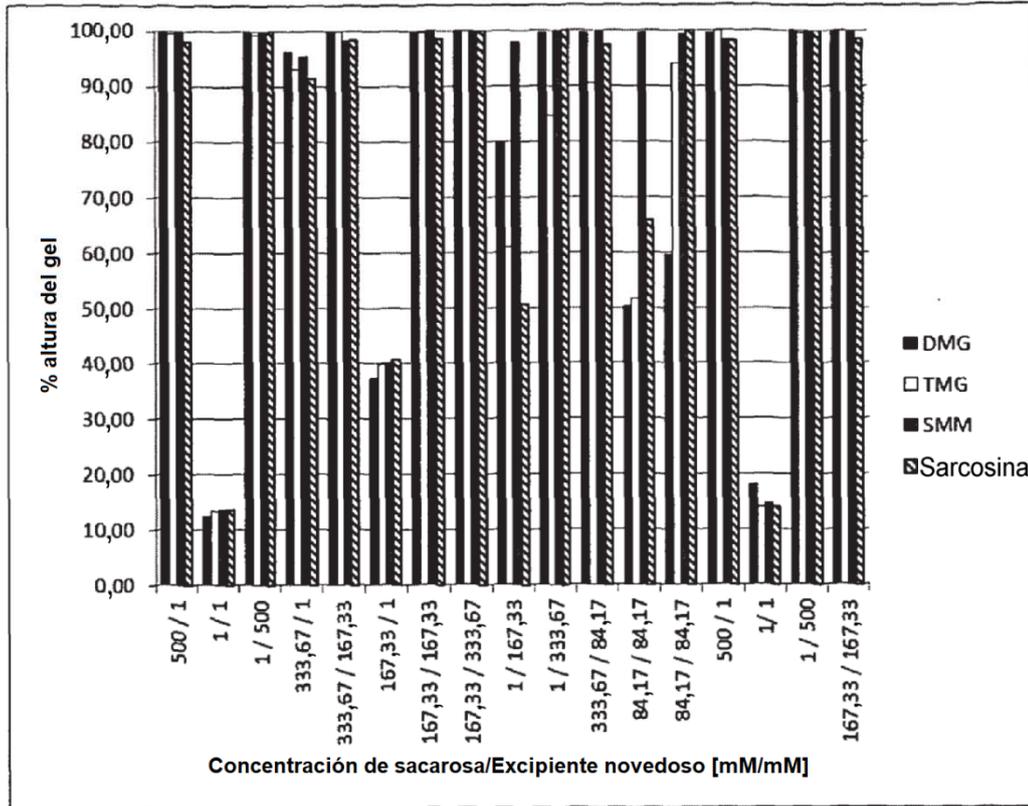


Figura 6

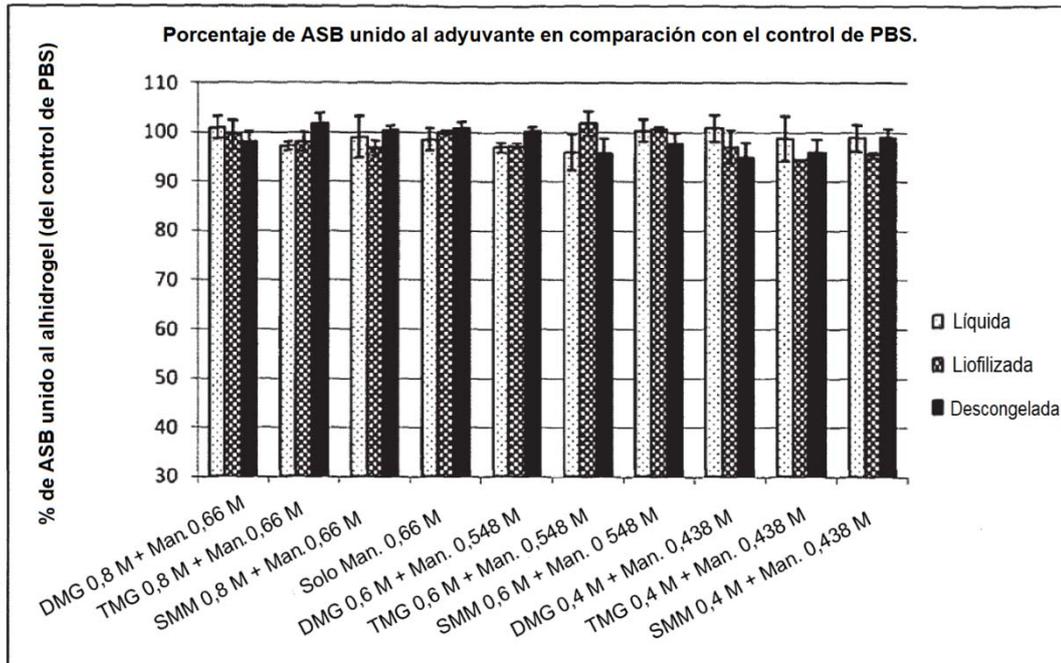


Figura 7

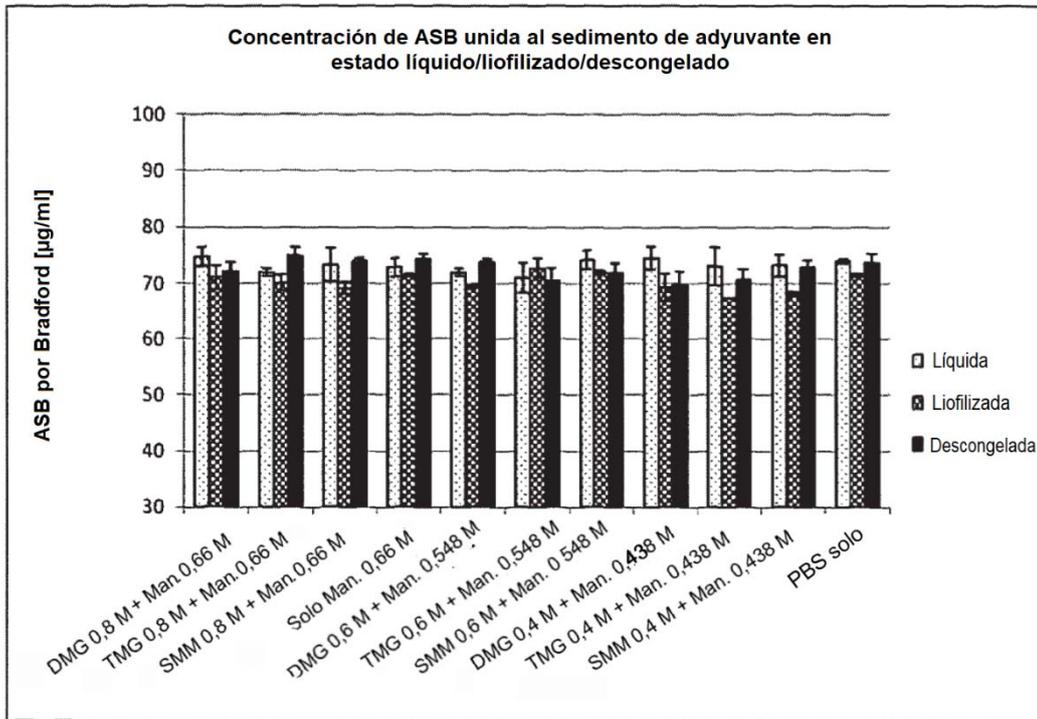


Figura 8

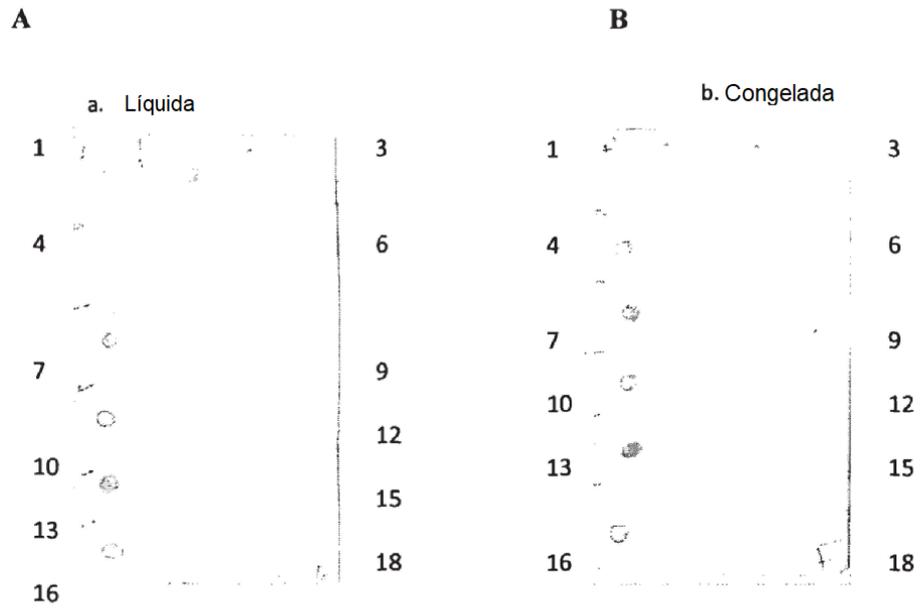


Figura 9

