

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 961**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2010** **E 17176652 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019** **EP 3249405**

54 Título: **Composición estabilizante para biomoléculas inmovilizadas**

30 Prioridad:

31.03.2009 EP 09004734

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

30.04.2020

73 Titular/es:

**LEUKOCARE AG (100.0%)
Am Klopferspitz 19
82152 Martinsried / München, DE**

72 Inventor/es:

**MARGRAF, STEFAN;
BREUER, ANJA;
SCHOLZ, MARTIN y
ALTRICHTER, JENS**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 757 961 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

Composición estabilizante para biomoléculas inmovilizadas

5 La presente invención se define mediante las reivindicaciones y se refiere a al uso de una composición que comprende al menos tres aminoácidos diferentes para estabilizar biomoléculas inmovilizadas sobre un portador sólido. La invención se refiere además a un método para producir biomoléculas estabilizadas, que comprende incrustar las biomoléculas en la composición según la invención y a un método de producción de un portador sólido que tiene biomoléculas unidas al mismo. La invención además se refiere a un portador sólido que se puede producir o producido mediante el método de la invención y a un método de diagnóstico de una enfermedad usando el portador de la invención.

15 Un desafío importante cuando se trabaja con biomoléculas inmovilizadas como por ejemplo proteínas como anticuerpos en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas es mantener la actividad de las biomoléculas. Sin embargo, puesto que las propiedades químicas, físicas o fisiológicas de las moléculas biofuncionales a menudo se alteran significativamente por variaciones en el entorno que rodea a los compuestos, esta es una tarea difícil. Por ejemplo, cambios en el pH, fuerza iónica, temperatura o almacenamiento pueden dar como resultado cambios reversibles o irreversibles en el carácter de los compuestos. Especialmente las biomoléculas que se someten a estrés como por ejemplo almacenamiento a largo plazo, transporte o procedimientos de esterilización tienen que estabilizarse con el fin de evitar una pérdida de actividad.

20 Para los inmunodiagnósticos clínicos, se requiere una estabilización suficiente de las biomoléculas inmovilizadas que se usan en ensayos de diagnóstico para la entrada en el mercado de productos según la "Guía de diagnóstico *in vitro* de la UE" (IVDD 98/79/CE).

25 Los dispositivos médicos implantables que contienen biomoléculas inmovilizadas, por ejemplo, están expuestos a una amplia variedad de agentes biológicos presentes en los tejidos del cuerpo, por ejemplo, ácidos, bases, iones y similares, dependiendo de la ubicación del implante en el cuerpo. Algunos de estos agentes pueden degradar las biomoléculas del dispositivo conduciendo a daños o incluso el fallo del dispositivo.

30 Los portadores o dispositivos disponibles comercialmente que contienen preparaciones de biomoléculas inmovilizadas, por tanto, contienen estabilizadores como azúcares (por ejemplo, trehalosa) y/o proteínas derivadas del suero (por ejemplo, albúmina) con el fin de proteger las biomoléculas de la degradación (Polifke T. y Rauch P, Laborwelt (2007) vol. 6, págs. 1-4).

35 Los estabilizadores que contienen proteínas derivadas del suero tienen la ventaja de que, además de su efecto estabilizante, también funcionan como agentes bloqueantes evitando la unión inespecífica. Sin embargo, puesto que las albúminas y similares son de origen humano o animal, pueden contener patógenos como, por ejemplo, virus o priones. Por tanto, deben aplicarse métodos de purificación complejos, costosos y que requieren mucho tiempo con el fin de eliminar estos patógenos.

40 Otra desventaja de los métodos convencionales para evitar el daño a biomoléculas inmovilizadas durante el estrés, como esterilización o almacenamiento a largo plazo, es que estos métodos requieren que dichas biomoléculas estén congeladas (Documento US 5.730.933; Cleland J.L. *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences (2001) vol. 90, n.º 3, págs. 310-321). Por ejemplo, el documento US 5.730.933 describe un método para esterilizar anticuerpos, mediante el cual la actividad de estos anticuerpos puede retenerse congelándolos durante la esterilización. Sin embargo, la congelación puede conducir a cambios conformacionales de las biomoléculas que pueden afectar a su biofuncionalidad y constituye una etapa más en la preparación de biomoléculas inmovilizadas que provoca costes adicionales. Además, la composición estabilizante contiene proteínas séricas como la albúmina que son de origen animal y, por tanto, conllevan el riesgo de contaminar las biomoléculas que se incuban en ellas.

45 Por tanto, existe la necesidad de métodos y medios mejorados para estabilizar y proteger biomoléculas inmovilizadas que se usan en terapia y diagnóstico. Por tanto, el objeto de la invención es la provisión de métodos y medios para la estabilización de biomoléculas que eviten las desventajas del estado de la técnica.

50 Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende al menos tres aminoácidos diferentes para estabilizar biomoléculas inmovilizadas sobre un portador sólido.

55 También se describe en el presente documento el uso de una composición que comprende (a) al menos dos aminoácidos diferentes, (b) al menos dos aminoácidos diferentes y una saponina y/o (c) al menos un dipéptido para estabilizar biomoléculas sobre un portador sólido.

60 Una composición usada según la invención puede ser líquida o sólida, dependiendo del estado o uso previsto. Una composición que cubre y/o que incrusta las biomoléculas unidas a un portador según la invención tal como se describe a continuación es generalmente sólida, mientras que en el método de producción de un portador de la invención tal como también se describe a continuación, la composición es habitualmente líquida. Tras la eliminación

de la parte líquida de la composición y/o el secado, la composición que cubre y/o que incrusta las biomoléculas unidas a un portador según la invención tal como se describe a continuación es sólida de nuevo. Si la composición es líquida, es preferiblemente acuosa.

5 Los aminoácidos se definen como moléculas orgánicas que tienen un grupo funcional carboxílico y uno amino. Son elementos estructurales esenciales de las proteínas. En relación con la presente invención, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos libres que no están unidos entre sí formando oligo- o polímeros tales como dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos o proteínas.

10 Los aminoácidos que están contenidos en la composición estabilizante pueden seleccionarse de aminoácidos que se producen de manera natural, así como aminoácidos artificiales o derivados de los mismos. Aminoácidos que se producen de manera natural son por ejemplo los 20 aminoácidos proteínogénicos glicina, prolina, arginina, alanina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico (en relación con la presente invención, los términos ácido aspártico y ácido glutámico también incluyen las sales de estos aminoácidos), glutamina, cisteína, fenilalanina, lisina, leucina, isoleucina, histidina, metionina, serina, valina, tirosina, treonina y triptófano. Otros aminoácidos que se producen de manera natural son por ejemplo carnitina, ornitina, hidroxiprolina, homocisteína, citrulina, hidroxilisina o beta-alanina. Derivados de aminoácidos son por ejemplo n-acetil-triptófano, fosfonoserina, fosfontreonina, fosfontirosina, melanina, ácido argininosuccínico y sales del mismo o DOPA. Aminoácidos artificiales son aminoácidos que tienen una diferente longitud de cadena lateral y/o estructura de cadena lateral y/o tienen el grupo amino en un sitio diferente del átomo de C alfa.

25 El término "estabilizante" en el contexto de la presente invención se refiere a cualquier efecto de la composición usada según la presente invención que da como resultado la estabilización de la estructura y/o actividad de una biomolécula (inmovilizada), la prolongación de la vida útil de almacenamiento de una biomolécula y/o la protección de una biomolécula frente al estrés. Esto da como resultado una actividad biológica de la biomolécula que se retiene en un grado significativo. El término "estrés" tal como se usa en relación con la presente invención y tal como se usa de manera intercambiable con el término "daño mediado por estrés" se refiere a cualquier influencia medioambiental que dé como resultado una pérdida de actividad de una biomolécula. Factores de estrés a modo de ejemplo son calor, sequía o radiación, tal como radiación inducida por métodos de esterilización descritos a continuación. Otro factor de estrés es el entorno químico. Por ejemplo, gases tales como óxido de etileno usados en la esterilización pueden contribuir a la pérdida de actividad de una biomolécula.

35 El término "actividad biológica" se refiere a una actividad que se produce de manera natural de una biomolécula. Las actividades biológicas dependen de la biomolécula específica e incluyen la afinidad de unión a otras (bio)moléculas o actividades catalíticas. La actividad biológica de un anticuerpo, por ejemplo, requiere la unión específica de su antígeno. La actividad biológica de una sonda de ácido nucleico requiere por ejemplo su capacidad para hibridarse específicamente con la diana de ácido nucleico a la que es complementaria. En este sentido, el término "retenido en un grado significativo" indica una actividad biológica restante de biomoléculas (inmovilizadas) que se han expuesto a estrés en comparación con biomoléculas (inmovilizadas) no expuestas a estrés de al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 70% y lo más preferiblemente al menos el 80%.

45 El término "biomolécula" describe cualquier molécula orgánica que puede producirse o se produce por un organismo vivo, incluyendo, preferiblemente, moléculas poliméricas biodegradables tales como proteínas o péptidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, así como moléculas pequeñas como metabolitos primarios, metabolitos secundarios y productos naturales. El término "biomolécula" no solo comprende moléculas nativas porque pueden aislarse de un organismo vivo, sino también moléculas que se producen de manera natural o artificiales que se producen de manera sintética, semisintética o recombinante. Moléculas artificiales son, por ejemplo, las derivadas de moléculas que se producen de manera natural con alteraciones introducidas. Moléculas poliméricas biodegradables distintas de las que pertenecen a las clases mencionadas anteriormente son lignina y polihidroxilalcanoatos (polímeros naturales) y ésteres de polialcileno, poli(ácido láctico) y sus copolímeros, poli(ésteres de amida), poli(ésteres de vinilo), poli(alcoholes vinílicos) y polianhídridos (polímeros artificiales). Las biomoléculas preferidas ejercen propiedades que son relevantes para aplicaciones farmacéuticas, de diagnóstico y/o científicas. En otras palabras, las biomoléculas aplicables en la presente invención ejercen preferiblemente una actividad biológica que las hace preferiblemente útiles y aplicables como agente(s) farmacéuticamente activo(s), agente(s) de diagnóstico y/o herramienta(s) de investigación.

60 Para el experto en la materia, se entiende que el término "biomoléculas" tal como se aplica en la presente invención también comprende biomoléculas tal como se describió anteriormente que están comprendidas en o sobre estructuras tales como células eucariotas o procariotas, tejidos, virus, así como fragmentos de los mismos (por ejemplo, orgánulos, membranas o cápsidas). En esta realización de la presente invención, las biomoléculas pueden unirse al vehículo sólido en forma aislada o comprendidas en o sobre dichas células eucariotas o procariotas, tejidos, virus o fragmentos de los mismos. Alternativamente, las estructuras que comprenden las biomoléculas, preferiblemente en su superficie, pueden servir como portadores según la presente invención.

65 El término "polipéptido" usado de manera intercambiable con el término "proteína" tal como se usa en el presente documento describe un grupo de moléculas que comprende el grupo de polipéptidos, que consisten en más de 30

aminoácidos. En contraposición a ello, una molécula que consiste en hasta 30 aminoácidos se denomina “péptido”. También en línea con la definición, el término “péptido” describe fragmentos de proteínas de una longitud de 30 aminoácidos o menos. Los polipéptidos o péptidos pueden formar además dímeros, trímeros y oligómeros superiores, es decir, que consisten en más de un polipéptido o molécula peptídica. Los polipéptidos o moléculas peptídicas que forman tales dímeros, trímeros, etc. pueden ser idénticos o no idénticos. Las estructuras de orden superior correspondientes se denominan, en consecuencia, homo- o heterodímeros, homo- o heterotrímeros, etc. Los términos “polipéptido”, “proteína” y “péptido” también se refieren a polipéptidos/proteínas y péptidos modificados de manera natural, en los que la modificación se efectúa por ejemplo por glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Tales modificaciones se conocen bien en la técnica.

El término “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico”, de acuerdo con la presente invención, incluye ADN, tal como ADNc o ADN genómico, y ARN tal como ARN antisentido o ARNip. Se incluyen además moléculas que imitan al ácido nucleico conocidas en la técnica tales como derivados sintéticos o semisintéticos de ADN o ARN y polímeros mixtos. Tales moléculas que imitan al ácido nucleico o derivados de ácido nucleico incluyen ácido nucleico de fosforotioato, ácido nucleico de fosforamidoato, ácido 2'-O-metoxietilribonucleico, ácido nucleico de morfolino, ácido nucleico de hexitol (HNA), ácido nucleico bloqueado (LNA) y ácido nucleico peptídico (PNA) (véase Braasch y Corey, Chem Biol 2001, 8: 1). LNA es un derivado de ARN en el que el anillo de ribosa está constreñido por una unión metileno entre el 2'-oxígeno y el 4'-carbono. Las moléculas de ácido nucleico pueden contener bases nucleotídicas no naturales o derivadas adicionales, tal como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Las moléculas de ácido nucleico incluyen además ribozimas, aptámeros, plásmidos y cromosomas. Las moléculas de ácido nucleico pueden usarse de acuerdo con la presente invención en forma aislada o en complejo con otras biomoléculas tales como proteínas, por ejemplo, proteínas de histona o proteínas del ribosoma.

El término “hidrato de carbono” se refiere a un compuesto orgánico que es un aldehído o una cetona con varios grupos hidroxilo añadidos, habitualmente uno en cada átomo de carbono que no es parte del grupo funcional aldehído o cetona. Dependiendo de la longitud de la molécula, los hidratos de carbono se denominan mono, oligo o polisacáridos. Tan pronto como los hidratos de carbono se unen a moléculas distintas de hidratos de carbono, las moléculas resultantes se denominan glucósidos. Los hidratos de carbono modificados tienen, por ejemplo, cadenas laterales de N-acetiléster, caboxilo o sulfato y pueden contener ácido glucurónico, ácido idurónico, galactosamina, glucosamina.

Biomoléculas preferidas son proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y sus derivados, hidratos de carbono y sus derivados, así como lípidos y ácidos grasos, polialcoholes y combinaciones o modificaciones de los mismos. Ejemplos de proteínas son anticuerpos o fragmentos de los mismos que retienen su especificidad de unión, enzimas, receptores, proteínas de membrana (opcionalmente sin su dominio transmembrana), factores de crecimiento, albúminas, globulinas, citocinas, proteínas de transporte, factores de coagulación sanguínea y hormonas proteicas. Hidratos de carbono a modo de ejemplo son amilopectina, glucógeno, almidón, alfa y beta-glucano, dextrano y glucosaminoglucanos como ácido hialurónico, heparina, heparán sulfato, condroitín sulfato y derivados de los mismos tales como glucósidos.

Proteínas especialmente preferidas son anticuerpos o fragmentos de los mismos que retienen su especificidad de unión. Los anticuerpos aplicables en la presente invención pueden ser, por ejemplo, policlonales o monoclonales. El término “anticuerpo” también comprende derivados de anticuerpos que retienen todavía su especificidad de unión. Los fragmentos de anticuerpos comprenden, entre otros, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂ o Fv. En la técnica, se conocen bien técnicas de producción de anticuerpos y fragmentos de los mismos y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane “Antibodies, A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 y Harlow y Lane “Using Antibodies: A Laboratory Manual” Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998. Estos anticuerpos pueden usarse, por ejemplo, para inmunoprecipitación de moléculas de interés o para eliminar moléculas no deseadas de los líquidos corporales de un paciente. El término “anticuerpo” también incluye realizaciones tales como anticuerpos sintéticos, quiméricos, de cadena sencilla y humanizados o derivados o fragmentos de los mismos que retienen todavía su especificidad de unión. En la técnica se conocen diversos procedimientos y pueden usarse para la producción de tales anticuerpos y/o fragmentos. Además, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla que se unen específicamente a una molécula de interés o fragmentos de la misma. Además, pueden usarse animales transgénicos para expresar anticuerpos humanizados. Lo más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos mediante cultivos de líneas celulares continuos. Los ejemplos de tales técnicas incluyen la técnica de hibridoma (Kohbor y Milstein Nature 256 (1975), 495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor, Immunology Today 4 (1983), 72) y la técnica de hibridoma de VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96). Puede usarse resonancia de plasmón superficial tal como se emplea en el sistema de BIAcore para aumentar la eficacia de anticuerpos frente a fagos que se unen a un epítipo de una biomolécula de interés (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). También se prevé en el contexto de esta invención que el término “anticuerpo” comprenda constructos de anticuerpo que pueden expresarse en células, por ejemplo, constructos de anticuerpo que pueden transfectarse y/o transducirse por medio de, entre otros, virus o vectores de plásmido. Una vez que se ha obtenido el anticuerpo o fragmento del mismo, el propio anticuerpo

o el ADN que lo codifica puede secuenciarse proporcionando la información para producir de manera recombinante el anticuerpo o fragmento del mismo en pequeña o gran escala. El experto en la técnica conoce métodos de la producción de un anticuerpo recombinante. El anticuerpo o derivado o fragmento del mismo puede modificarse químicamente además tal como se conoce bien en la técnica.

5 El anticuerpo puede ser de cualquier clase de anticuerpo. Lo más preferido es que el anticuerpo sea monoclonal y de la clase de IgG, IgM o IgY. Los anticuerpos de IgY representan los análogos de anticuerpos de IgG en pollo.

10 El término “inmovilizado” o “inmovilizar” tal como se usa de manera intercambiable con el término “unido” o “unir” se refiere a la fijación de las biomoléculas sobre el portador. Dicha inmovilización o unión o fijación puede ser irreversible o reversible. La fijación puede deberse a enlaces covalentes o no covalentes formados entre el material del portador y las biomoléculas. Las interacciones no covalentes a modo de ejemplo incluyen las que conducen a adsorción. La fijación de la(s) biomolécula(s) al portador puede realizarse mediante cualquier técnica conocida en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, Hermanson, G.T., Bioconjugate Technique (2008), 2ª edición): La fijación puede efectuarse por ejemplo por medio de una unión directa de las biomoléculas al portador sólido. 15 Alternativamente, la fijación puede efectuarse por medio de una unión indirecta por medio de un tercer compuesto tal como moléculas de espaciador y ligador, por ejemplo, silanos o proteínas tales como biotina, avidina o estreptavidina, que cubren el portador sólido. El término “cubrir” tal como se usa a lo largo de la presente invención comprende cobertura completa, así como cobertura parcial del portador sólido. En ambas alternativas, la unión 20 puede ser una unión por medio de un enlace covalente o uno no covalente. Un enlace covalente puede lograrse por ejemplo por medio de una reacción química entre las biomoléculas y un material portador o entre la molécula de espaciador/ligador y las biomoléculas. Los ejemplos de unión no covalente comprenden enlaces débiles tales como enlaces de van-der-Waal u otros enlaces polares. Tales enlaces no covalentes se producen por ejemplo entre polipéptidos o péptidos y un portador sólido con una superficie de polietileno.

25 En una realización preferida, las biomoléculas se unen reversiblemente sobre dicho portador sólido.

30 El término “unido reversiblemente” define que las biomoléculas, cuando se unen al portador, pueden liberarse de dicho portador con medios adecuados. Dependiendo de la clase de unión, por ejemplo, de si la unión es covalente o no covalente, son aplicables diferentes medios de liberación de las biomoléculas. Ejemplos son escisión mediante proteasas en el caso de proteínas como biomoléculas, un cambio de pH o un cambio en la temperatura. Las biomoléculas se unen al portador hasta que se necesitan y sólo entonces se liberan del portador. Las técnicas mencionadas anteriormente son solo ejemplos para inmovilizar o unir reversiblemente biomoléculas sobre portadores sólidos. Se enfatiza que la presente invención no se limita a estos ejemplos. En su lugar, puede aplicarse 35 cualquier método convencional conocido en el estado de la técnica para inmovilizar o unir reversiblemente la(s) biomolécula(s) sobre un portador sólido.

40 La unión reversible de la biomolécula se elige de tal manera que la biomolécula puede liberarse rápidamente del portador. En este sentido, el término “rápidamente” significa que más del 50% de dicha biomolécula, tal como el 60%, el 70% o el 80%, puede liberarse en el plazo de 2 horas o menos, tal como 1 hora, 30 minutos o 20 minutos, en cualquier combinación tal como el 60% en 30 minutos o 20 minutos, el 70% en 30 minutos o 20 minutos o el 80% en 30 minutos o 20 minutos, preferiblemente más del 85% en el plazo de 10 minutos o menos y lo más preferiblemente más del 98% en el plazo de 1 minuto. Esto puede lograrse por ejemplo aplicando uno de los métodos descritos a continuación. Además, la unión reversible de las biomoléculas se elige preferiblemente de tal 45 manera que las biomoléculas se liberan inmediatamente antes de la aplicación clínica.

La unión reversible, como la unión irreversible, puede ser covalente o no covalente.

50 Preferiblemente, los enlaces no covalentes son enlaces no covalentes con alta afinidad y especificidad. Ejemplos de tales enlaces no covalentes son los formados por el sistema de estreptavidina-biotina o el de avidina-biotina. En este ejemplo, se acopla estreptavidina/avidina covalentemente a un portador adecuado. La biomolécula biotinilada se une entonces de manera no covalente pero con alta afinidad a la estreptavidina/avidina. Añadiendo biotina en exceso, la unión se suprime de manera competitiva y la biomolécula biotinilada se libera.

55 La biomolécula puede unirse por medio de un ligador, preferiblemente un ligador escindible. Pueden seleccionarse ligadores adecuados de, pero sin limitarse a

60 a) ligadores con puentes disulfuro como SDAD (NHS-SS-diazirina), SulfoSAND, DSP que pueden escindirse fácilmente mediante la adición de reactivos con grupos -SH como tioles, mercaptanos, cisteína, mecaptoetanol o ditiotreitól.

b) ligadores con enlaces peptídicos que pueden escindirse con una proteasa específica, preferiblemente una enzima humana

65 c) ligadores que son escindibles por medio de ultrasonidos

- d) ligadores con enlaces éster como EGS que pueden escindirse mediante, por ejemplo, hidroxilamina
- e) ligadores con sulfonas como BSOCOES que pueden escindirse a pH superior (por ejemplo, pH 11,6)

5 d) ligadores con cis-dioles como DST que pueden escindirse mediante meta-peryodato de sodio.

Alternativamente, las biomoléculas pueden unirse reversiblemente mediante secado tal como se indicó anteriormente y tal como se describe en detalle adicionalmente a continuación en relación con los métodos de la invención. En esta realización, se logra la unión reversible porque las biomoléculas y las moléculas usadas como estabilizador (es decir, aminoácidos, opcionalmente en conexión con una saponina y/u opcionalmente en conexión con al menos un di- y/o tripéptido tal como se describe) y el portador sólido se pegan entre sí tras el secado. La liberación de las biomoléculas tiene lugar tras la adición de un líquido a los compuestos anteriores disolviendo/solubilizando así las biomoléculas y las moléculas estabilizantes del portador.

15 El término "portador sólido" define en el contexto de la invención un portador de material sólido. El material del portador puede ser o bien de estructura compacta o bien porosa. Tal como se describe a continuación en el presente documento, se prefiere que el portador sea de un material seleccionado del grupo que consiste en vidrio, acero inoxidable de calidad médica, aleaciones de metal (por ejemplo cromo cobalto molibdeno, titanio óxido de nitruro), hidroxiapatita, silicona, poliestireno, poli(ácido L-láctico); poliuretano, poliéster, polisulfona, polietileno, polipropileno, poliacrilo, poliacrilonitrilo, poliamida, PMMA, guata de lana, vidrio o plástico de espuma de poro abierto y vidrio o plástico reticular y estructuras derivadas de esponjas marinas (poríferos).

En el transcurso de la presente invención, se encontró sorprendentemente que biomoléculas inmovilizadas sobre un portador sólido pueden estabilizarse aplicando una composición que comprende al menos tres aminoácidos diferentes. Esta composición cubre o incrusta las biomoléculas y las protege de las influencias adversas. Análogo al término "cubrir", el término "incrustar" tal como se usa a lo largo de la presente invención comprende la incrustación parcial o completa de las biomoléculas mediante la composición usada según la invención. Tal como se muestra en los ejemplos adjuntos, las biomoléculas inmovilizadas cubiertas por o incrustadas en la composición usada según la invención muestran un marcado aumento en la resistencia a estrés tal como envejecimiento o esterilización al tiempo que mantienen esencialmente su actividad biológica.

Una ventaja importante de la composición estabilizante de la presente invención es que se usan como estabilizadores aminoácidos y no proteínas derivadas del suero como por ejemplo albúminas. A diferencia de estas últimas que se derivan de seres humanos o animales, los aminoácidos de la composición estabilizante usada según la presente invención pueden producirse de manera sintética. Por tanto, el riesgo de contaminación por patógenos como virus o priones se reduce o se evita.

Además de su efecto protector sobre las biomoléculas, también se encontró que la composición estabilizante tenía el efecto adicional de bloquear sitios de unión libres sobre el portador sólido que tenía biomoléculas unidas al mismo.

Además, tal como se confirma en los ejemplos adjuntos, la composición estabilizante usada según la invención puede aplicarse universalmente: es adecuada para la protección de diferentes moléculas tales como anticuerpos (por ejemplo, IgM, IgG), enzimas (por ejemplo, ADNasa) o ácidos nucleicos.

45 El método para estabilizar biomoléculas de la presente invención tiene la ventaja adicional de que, a diferencia de métodos de estabilización convencionales, no requiere la congelación de las biomoléculas. Por tanto, pueden evitarse los cambios conformacionales que pueden producirse durante el proceso de congelación. Por tanto, el método de estabilización de la presente invención es especialmente adecuado para biomoléculas inestables o lábiles, como por ejemplo anticuerpos, especialmente la estructura compleja de moléculas de IgM.

Además, sorprendentemente, se encontró que incubando biomoléculas tales como anticuerpos en la composición estabilizante de la presente invención, la capacidad de estas biomoléculas para ejercer su actividad biológica, por ejemplo, en el caso de anticuerpos para unirse a su antígeno, puede retenerse hasta al menos el 65% cuando se esterilizan mediante irradiación con 25 kGy en comparación con controles sin tratar. Es decir, con la composición estabilizante de la presente invención, puede lograrse un aumento significativo de retención de funcionalidad de las biomoléculas incrustadas en comparación con estabilizadores convencionales tal como se da a conocer por ejemplo en el documento US 5.730.9333 cuando se irradian con 25 kGy.

La composición usada según la presente invención no contiene preferiblemente proteínas o fragmentos de proteínas que no sean aminoácidos, dipéptidos y/o tripéptidos. Por consiguiente, en esta realización preferida de la presente invención, la composición no contiene proteínas o fragmentos de las mismas que consisten en más de tres aminoácidos, ni proteínas hidrolizadas que sean de origen humano o animal. Una composición de este tipo tiene la ventaja de que no hay riesgo de contaminación de las biomoléculas incrustadas en la misma. Además, es una alternativa económica a composiciones estabilizantes conocidas.

En una realización preferida de la presente invención, la composición estabilizante comprende al menos 4, al menos

5, al menos 6, al menos 7 o al menos 8 aminoácidos diferentes o más tal como al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos diferentes. El número de aminoácidos diferentes comprendido en la composición preferiblemente no excede de 18.

5 Tal como resulta evidente a partir de los ejemplos adjuntos, la composición según la invención, cuando se usa para estabilizar biomoléculas inmovilizadas, ejerce sus efectos ventajosos ya cuando están presentes dos o tres aminoácidos diferentes. El efecto aumenta entonces gradualmente y el efecto máximo se alcanza cuando están presentes de cinco a ocho aminoácidos diferentes en la composición estabilizante. Dependiendo del procedimiento
10 aplicado para someter a prueba el efecto estabilizante, el efecto máximo se alcanza cuando están presentes 5 aminoácidos diferentes (tal como para envejecimiento potenciado) o cuando están presentes ocho aminoácidos diferentes (tal como para esterilización). Los efectos ventajosos no disminuyen o no disminuyen esencialmente con la adición de aminoácidos diferentes adicionales a la composición estabilizante usada según la invención, sino que se retienen preferiblemente. Por consiguiente, también pueden usarse composiciones que comprenden al menos 9,
15 al menos 10, al menos 11 tal como al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos diferentes para estabilizar biomoléculas inmovilizadas.

En una realización preferida, la composición comprende al menos 4 o al menos 5 aminoácidos.

20 Tal como resulta evidente a partir de los ejemplos, la composición según la invención, cuando comprende al menos 4 o al menos 5 aminoácidos, tiene un efecto incluso más ventajoso sobre la estabilidad de biomoléculas inmovilizadas sobre un portador sólido. Dependiendo de la combinación de aminoácidos, la actividad biológica residual tras la exposición a estrés llega hasta el 87%.

25 En una realización adicional preferida, la composición comprende al menos un aminoácido de cada grupo de (a) un aminoácido con grupos R no polares, alifáticos; (b) un aminoácido con grupos R polares, no cargados; (c) un aminoácido con grupos R cargados positivamente; (d) un aminoácido con grupos R cargados negativamente; y (e) un aminoácido con grupos R aromáticos.

30 Los aminoácidos que se producen de manera natural pueden clasificarse en los grupos de características anteriores (Nelson D.L. & Cox M.M., 'Lehninger Biochemie' (2005), págs. 122-127) a partir de cada uno de los cuales se selecciona al menos un aminoácido para la composición según la invención. También pueden clasificarse correspondientemente otros distintos de aminoácidos que se producen de manera natural tales como aminoácidos
35 artificiales. Mientras que más de un aminoácido de cada grupo tal como al menos tres pueden estar comprendidos en la composición según la invención, se prefiere en el presente documento que sólo un aminoácido se seleccione de cada grupo. El experto entiende además que no tiene que estar presente el mismo número de aminoácidos de cada grupo en la composición usada según la invención. Más bien, puede elegirse cualquier combinación de aminoácidos siempre que esté presente al menos un aminoácido de cada grupo.

40 En una realización preferida, la composición comprende menos del 1%, preferiblemente menos del 0,5% en peso seco de cisteína dentro de la mezcla de al menos tres aminoácidos. Esto también se aplica a composiciones que comprenden al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 aminoácidos o incluso más tal como al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17,
45 al menos 18, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos diferentes.

Debido al grupo SH comprendido en la cisteína, composiciones que comprenden cisteína pueden someterse a oxidación que tiene lugar por ejemplo en los grupos SH y que da como resultado olores desagradables y/o posible cambio de color de la composición a tonos de marrón. Con el fin de minimizar estos efectos no deseados, en particular cuando la composición se usa en relación con dispositivos médicos, la cantidad de cisteína comprendida
50 en la composición debe reducirse tal como se describió anteriormente. Sin embargo, incluso si estos efectos no se desean, no afectan a la idoneidad de las composiciones de la invención que comprenden un mayor porcentaje de cisteína o que producen por lo demás colores parduzcos o un olor desagradable.

En una realización especialmente preferida, los aminoácidos comprendidos en la composición son alanina, ácido glutámico, lisina, treonina y triptófano. Mientras que, en determinadas realizaciones de la presente invención, la composición según la invención comprende más de los 5 aminoácidos anteriores, en una realización adicional preferida no están comprendidos otros aminoácidos distintos de alanina, ácido glutámico, lisina, treonina y triptófano en la composición.

60 En una realización alternativa preferida, los aminoácidos comprendidos en la composición son ácido aspártico, arginina, fenilalanina, serina, valina. De manera similar a lo anterior, mientras que en determinadas realizaciones de la presente invención, la composición según la invención comprende más de los 5 aminoácidos anteriores, en una realización adicional preferida no están comprendidos otros aminoácidos distintos de aspartato, arginina, fenilalanina, serina, valina en la composición.

65 En otra realización preferida, los aminoácidos comprendidos en la composición son prolina, serina, asparagina,

ácido aspártico, treonina y fenilalanina; o tirosina, isoleucina, leucina, treonina y valina; o arginina, glicina, histidina, alanina, ácido glutámico, lisina y triptófano. La última combinación de aminoácidos, es decir arginina, glicina, histidina, alanina, ácido glutámico, lisina y triptófano, se ha mostrado que es especialmente ventajosa con respecto a sus propiedades tras la esterilización, en particular tras la irradiación. Se mostró que dicha combinación de aminoácidos no produce ningún olor desagradable o alteración del color tras la irradiación.

De nuevo, mientras que en determinadas realizaciones de la presente invención, la composición según la invención comprende más de 5 o 6 o 7 aminoácidos, en una realización adicional preferida no están comprendidos otros aminoácidos distintos de las combinaciones enumeradas en esta realización preferida en la composición.

En otra realización preferida, la composición comprende además menos del 1%, más preferiblemente menos del 0,3% de Tween, preferiblemente Tween 80.

Tween es una forma genérica para polisorbatos que son una clase de emulsionantes y tensioactivos usados en algunas preparaciones farmacéuticas y alimentarias. Se usan a menudo para solubilizar ingredientes oleosos en productos a base de agua. Los polisorbatos son líquidos oleosos derivados de sorbitano pegilado (un derivado de sorbitol) esterificado con ácidos grasos. Ejemplos de polisorbatos son polisorbato 20 (Tween 20 o monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano), polisorbato 40 (Tween 40 o monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitano), polisorbato 60 (Tween 60 o monoestearato de polioxietileno (20) sorbitano) y polisorbato 80 (Tween 80 o monooleato de polioxietileno (20) sorbitano). Tween 80 es el más preferido en las composiciones usadas en la presente invención.

En el transcurso de la presente invención, se ha encontrado que la adición de menos del 1% de Tween (preferiblemente en relación con la masa seca de biomoléculas y aminoácidos) evita la formación de espuma durante la manipulación de la composición líquida según la invención.

Tal como se indicó anteriormente, la presente invención también se refiere al uso de una composición que comprende al menos un di y/o tripéptido para estabilizar biomoléculas inmovilizadas sobre un portador sólido. Las definiciones facilitadas anteriormente y la realización preferida descrita anteriormente, cuando sean aplicables, se aplican cambiando lo que se tenga que cambiar a esta realización de la presente invención. Por consiguiente, la composición puede estar compuesta por al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o al menos diez di- y/o tripéptidos diferentes. Dipéptidos a modo de ejemplo son glicilglutamina (Gly-Gln, que presenta una estabilidad potenciada en comparación con glutamina sola), gliciltirosina (Gly-Tyr), alanilglutamina (Ala-Gln, presentando estas dos últimas una solubilidad aumentada en agua en comparación con tirosina sola) y glicilglicina. Dipéptidos que se producen de manera natural adicionales son carnosina ((beta-alanil=L-histidina), anserina (beta-alanil-N-metilhistidina), homoanserina (N-(4-aminobutiril)-L-histidina), kitorfina (L-tirosil-L-arginina), balenina (u ofidina) (beta-alanil-N-tau-metilhistidina), glorina (éster etílico de N-propionil-γ-L-glutamyl-L-ornitina-δ-lac) y baretina (ciclo-[(6-bromo-8-en-triptófano)-arginina]). Dipéptidos artificiales adicionales son aspartamo (éster 1-metílico de N-L-a-aspartil-L-fenilalanina) y pseudoprolina. Tripéptidos a modo de ejemplo son glutatión (γ-glutamyl-cisteinil-glicina) y sus análogos ácido oftálmico (L-γ-glutamyl-L-α-aminobutiril-glicina) y ácido noroftálmico (γ-glutamyl-alanil-glicina). Tripéptidos adicionales son isoleucina-prolina-prolina (IPP), gliptomato (gly-pro-glu), hormona liberadora de tirotrópina (TRH, tiroliberina o protirelina) (L-piroglutamyl-L-histidinil-L-prolinamida), melanostatina (proil-leucil-glicinamida), leupeptina (N-acetil-L-leucil-L-leucil-L-argininal) y eisenina (pGlu-Gln-Ala-OH). Se prefiere que el al menos un tripéptido y más preferiblemente todos los tripéptidos usados como estabilizador, cuando se usan en relación con aplicaciones médicas según la invención (véase a continuación) no ejerzan ninguna propiedad farmacológica. La composición según esta realización de la invención no contiene preferiblemente proteínas o fragmentos de proteínas que no sean aminoácidos, dipéptidos o tripéptidos. Por consiguiente, en esta realización preferida de la presente invención, la composición no contiene proteínas o fragmentos de las mismas que consistan en más de tres aminoácidos. En su lugar, la composición según esta realización comprende preferiblemente además al menos un aminoácido, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres, incluso más preferiblemente al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez aminoácidos diferentes o más tal como al menos once, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos diferentes.

En una realización preferida, la composición usada según la invención comprende además una saponina.

Las saponinas son una clase de compuestos químicos que forman metabolitos secundarios que se encuentran en fuentes naturales, se derivan de fuentes naturales o pueden sintetizarse químicamente. Se encuentran saponinas en abundancia particular en diversas especies vegetales. Las saponinas son glucósidos anfipáticos agrupados fenomenológicamente por la espumación similar al jabón que producen cuando se agitan en disoluciones acuosas, y estructuralmente por su composición de uno o más restos de glucósidos hidrófilos combinados con un derivado de triterpeno lipófilo. Ejemplos de saponinas son ácido glicirrítico, ácido glicirretínico, ácido glucurónico, escina, hederacósido y digitonina. Se prefiere que la saponina usada como estabilizador, cuando se usa en relación con aplicaciones médicas según la invención (véase a continuación) no ejerza ninguna propiedad farmacológica.

En una realización más preferida, está comprendida una saponina en una composición que comprende cualquier

número de aminoácidos diferentes comprendido en la lista anterior de números mínimos de aminoácidos, tal como en una composición que comprende al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 aminoácidos diferentes o incluso más, tales como al menos once, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos diferentes.

En una realización más preferida, la saponina es ácido glicirrónico (también: ácido glicirricico), también conocido como glicirricina o ácido glicirricínico o un derivado del mismo.

En la técnica se conocen bien derivados de ácido glicirrónico e incluyen los producidos mediante transformación de ácido glicirrónico en grupos carboxilo e hidroxilo, mediante conjugación de residuos de aminoácido en la parte de hidrato de carbono o la introducción de 2-acetamido- β -D-glucopiranosilamina en la cadena de glucósido del ácido glicirrónico. Otros derivados son amidas de ácido glicirrónico, conjugados de ácido glicirrónico con dos residuos de aminoácido y una función 30-COOH libre y conjugados de al menos un residuo de ésteres alquílicos de aminoácido en la parte de hidrato de carbono de la molécula de ácido glicirrónico. Pueden encontrarse ejemplos de derivados específicos por ejemplo en Kondratenko *et al.* (Russian Journal of Bioorganic Chemistry, vol., 30(2), (2004), págs. 148-153).

En el transcurso de la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que tras la adición de ácido glicirrónico a la composición descrita anteriormente, las biomoléculas retienen incluso más de su actividad biológica que usando composiciones que comprenden solo aminoácidos como agentes estabilizantes. En este sentido, es particularmente notable que el ácido glicirrónico solo no ejerce ningún efecto estabilizante o protector sobre biomoléculas inmovilizadas.

En otra realización preferida, la composición estabilizante comprende además un polialcohol, preferiblemente un azúcar o alcohol de azúcar que se selecciona de xilosa, manosa, glucosa, fructosa, lactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, rafinosa, dextrano, manitol, sorbitol o inositol.

En una realización preferida adicional, la realización líquida de la composición es una disolución preferiblemente tamponada, preferiblemente acuosa, pero puede ser también agua o una disolución de sal no tamponada, preferiblemente acuosa. El tampón que va a usarse depende, entre otros, de la biomolécula que va a cubrirse/incrustarse. Tampones generalmente adecuados para el contacto con biomoléculas son por ejemplo fosfato, citrato, acetato, borato, carbonato, lactato, amonio, glicina, barbiturato, HEPES, MOPS, MES, TRIS. A continuación, se describen adicionalmente tampones a modo de ejemplo adecuados para anticuerpos.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método para estabilizar biomoléculas o para producir biomoléculas estabilizadas, que comprende (a) unir las biomoléculas a un portador sólido y (b) incrustar las biomoléculas en la composición según la invención, de modo que las biomoléculas incrustadas están parcial o completamente cubiertas por la composición de la invención. Anteriormente se han descrito posibles modos de inmovilización y pueden aplicarse en el presente método.

El procedimiento detallado de incrustación se describe adicionalmente a continuación en relación con el método de la invención de producción de un portador sólido, en particular la etapa (b) del mismo, pero opcionalmente también las etapas (c), (d) y/o (e).

La presente invención se refiere además a un método de producción de un portador sólido que tiene biomoléculas unidas al mismo, que comprende las etapas de

(a) unir las biomoléculas al portador sólido; y

(b) incubar el portador de la etapa (a) en la composición descrita según la invención.

Los términos "unir" e "inmovilizar" en relación con las biomoléculas se han definido y los detalles del procedimiento se han descrito anteriormente. Dicha definición y descripción se aplican igualmente a los métodos de la presente invención y otras realizaciones descritas a continuación. En particular, la unión de las biomoléculas puede ser reversible o irreversible tal como se definió anteriormente.

El término "incubar" se refiere a una incubación en condiciones que permiten que los compuestos mencionados en la etapa (a) se unan al portador y las biomoléculas unidas al portador sólido en la etapa (a) se incrusten en la composición estabilizante mencionada en la etapa (b). En esta realización, la composición que va a usarse para la incubación con el portador sólido es líquida y preferiblemente una disolución acuosa. La composición puede haber sido originalmente una composición sólida. En esta realización, la composición originalmente sólida se disuelve en un medio preferiblemente acuoso y por tanto está comprendida en una disolución preferiblemente acuosa. De ese modo, se forma una capa de recubrimiento posterior por encima de y/o alrededor de las biomoléculas que estabiliza las biomoléculas, entre otros, reduciendo su superficie accesible y asociándose con zonas complementarias de su estructura terciaria. Mientras que la composición es líquida tras su aplicación a las biomoléculas, se deshidrata

posteriormente dando como resultado una composición sólida que incrusta o cubre las biomoléculas. Las biomoléculas pueden incrustarse parcial o completamente en la composición en la etapa b). El experto entiende que las condiciones de incubación necesitan adaptarse a las biomoléculas unidas al portador sólido. Las condiciones de incubación incluyen aquellas en las que las incubaciones se efectúan desde 20 minutos hasta 12 horas dependiendo de la etapa y la temperatura. Pueden incubarse anticuerpos, por ejemplo, durante 1 hora a 37°C, que es la temperatura máxima a la que los anticuerpos de IgM son estables. Los anticuerpos de IgG pueden incubarse hasta 50°C. El intervalo de temperatura puede ser de desde 4°C hasta 50°C, preferiblemente de 20°C a 37°C, dependiendo de la etapa y el tiempo de incubación. En una realización preferida, la incubación en la etapa (b) se efectúa durante 1 hora a temperatura ambiente. Se entiende que con el fin de acelerar el procedimiento o mejorar los resultados, los tiempos y las temperaturas de incubación pueden variarse según las sustancias usadas en la incubación. El experto en la técnica es consciente de que el término "temperatura ambiente" puede implicar diferentes temperaturas dependiendo de la ubicación y la temperatura exterior. Habitualmente oscila entre 17°C y 23°C.

Preferiblemente, la composición líquida en la etapa (b) está tamponada y más preferiblemente tiene un bajo contenido en sal. Un bajo contenido en sal según la presente invención se define como una concentración de sal del 0,9% (p/p) o menos, preferiblemente menos del 0,2% (p/p). Generalmente, pero no exclusivamente, para anticuerpos tales como anticuerpos de IgG e IgY, un tampón más alcalino, por ejemplo, compuesto por carbonato de sodio 15 mM e hidrogenocarbonato de sodio 35 mM en agua (pH 9), es útil mientras que para la unión de IgM es favorable un tampón más neutro (pH 7,0 a 7,4), por ejemplo, un tampón fosfato como PBS.

Un portador sólido que resulta de la etapa (a), que es un portador sólido sobre el que se unen biomoléculas, se denomina también portador "recubierto" en el contexto de la presente invención.

Un portador recubierto sólido que resulta de la etapa (b), que es un portador sólido que se incuba con la composición según la invención que cubre y/o incrusta las biomoléculas unidas, se denomina también portador "recubierto posteriormente" en el contexto de la presente invención.

En una realización preferida, el método comprende además una etapa (c):

(c) eliminar la composición aplicada en la etapa (b).

Las etapas (a), (b) y (c) se llevan a cabo en el orden descrito anteriormente.

El término "eliminar" se refiere a la eliminación cualitativa o cuantitativa de la composición líquida después de la etapa (b). Por tanto, la composición se elimina al menos en un grado en el que la cantidad restante de la composición no cambia significativamente la calidad de una disolución usada en una etapa posterior del método de la invención. La eliminación cuantitativa da como resultado el secado del portador. La eliminación puede efectuarse, por ejemplo, mediante succión usando por ejemplo una bomba convencional a la que puede unirse una pipeta, y similares, compresión o soplado. Opcionalmente, tales etapas se combinan y pueden combinarse adicionalmente con secado al aire. Preferiblemente, la disolución se elimina en volumen hasta al menos el 95%, tal como al menos el 98% o al menos el 99%, el 99,5% o el 99,8%.

Por consiguiente, en una realización más preferida, cuando se efectúa la eliminación cuantitativa, el método de la invención comprende la etapa (c):

(c) someter el portador sólido a secado.

El secado puede realizarse usando técnicas bien conocidas tales como secado al aire, liofilización por secado por pulverización y precipitación. Técnicas adecuadas adicionales comprenden cristalización y microcristalización. En el caso de perlas o nanopartículas como portador, el secado puede efectuarse por liofilización, mientras que para otros portadores se prefieren otras técnicas de secado.

En una realización preferida alternativa de la invención, el método comprende además una etapa (c) después de la etapa (b):

(c) secar el portador hasta que el contenido líquido residual sea <20% (p/p).

Según esta realización preferida de la invención, el contenido líquido residual puede calcularse de una manera conocida para la determinación del contenido de agua de la madera. En el caso de la madera, el porcentaje de contenido de agua de la madera (x) se determina mediante el cálculo de la razón entre la masa del agua en la muestra (m_w) y la masa de la muestra de madera que contiene agua (m_u), multiplicado por 100. La masa de agua en la muestra (m_w) puede determinarse restando la masa de la muestra después de su desecación de la masa de la muestra de madera que contiene agua (m_u). En consecuencia, el porcentaje de contenido de agua de la madera se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$X (\%) = \frac{m_w}{m_u} * 100$$

5 El contenido de agua residual de una preparación de portadores puede determinarse por analogía, en donde m_w es la masa del agua en la muestra de portadores y m_u es la masa de la muestra de portadores después de la desecación completa de la muestra. En el caso de un portador esponjiforme, m_w se determina después de exprimir el agua en exceso de los poros.

En otra realización preferida de la invención, el método comprende además una etapa (a') después de la etapa (a):

10 (a') secar el portador hasta que el contenido líquido residual de la composición sea menor del 10%, preferiblemente menor del 5%, más preferiblemente menor del 2%, tal como menor del 1%, el 0,5% o el 0,2% de la composición aplicada originalmente. Se describen métodos de secado preferidos anteriormente e incluyen también métodos que se usan para eliminar la composición. Lo más preferido es que el secado se efectúe mediante secado al aire, secado por pulverización, liofilización, precipitación, cristalización o microcristalización.

15 El método de la invención puede comprender además una etapa (a'') posterior a la etapa (a) y anterior a la etapa (b) y opcionalmente después de la etapa (a'):

20 (a'') incubar el portador en una disolución acuosa tamponada que comprende un agente de bloqueo y eliminar la disolución acuosa.

25 Puede usarse un agente de bloqueo en el método para la producción de un portador sólido con el fin de evitar la unión inespecífica del material añadido en etapas posteriores del método. Este bloqueo también puede tener un efecto positivo sobre la estabilidad de la conformación de las biomoléculas antes de la incubación del portador en la composición líquida según la invención en la etapa (b). En este sentido, la composición según la invención puede usarse como agente de bloqueo. Otros agentes de bloqueo en línea con la presente invención comprenden, pero no se limitan a, suero humano y proteínas de tales sueros (por ejemplo, albúmina), leche, proteínas de huevo, proteínas derivadas de plantas (por ejemplo, soja, trigo), incluyendo hidrolizados de dichas proteínas (por ejemplo, gelatina, colágeno).

30 En otra realización preferida, el método de la invención comprende además una etapa (e) de esterilizar el portador sólido después de la etapa (b), (c) o (d). La capacidad para esterilizar el portador recubierto sólido producido mediante el método de la invención permite, entre otros, la producción de los portadores recubiertos sólidos en condiciones no estériles o semiestériles, en donde los portadores así producidos todavía pueden usarse en el método de la invención descrito a continuación que implica el contacto del portador recubierto sólido con un líquido corporal *ex vivo* o *in vitro*. Esto representa una característica superior adicional del método y el portador de la invención así producido, ya que, debido a esa característica, los costes para la producción del portador sólido pueden reducirse en comparación con los costes para la producción de portadores que pueden no estar esterilizados. Esto se debe a que, en el proceso de producción, no se requieren condiciones estériles. Tal como se conoce bien, los portadores preparados convencionalmente no son adecuados para la esterilización y deben producirse en condiciones completamente estériles. Además, una característica que contribuye a los costes es que dichos portadores pueden reciclarse después de su uso mediante esterilización. Los portadores reciclados pueden usarse posteriormente en un tratamiento adicional del mismo paciente o de un paciente diferente o en un método de diagnóstico adicional o igual. Preferiblemente, la esterilización o el reciclaje del portador se efectúa mediante óxido de etileno (EO), radiación beta, radiación gamma, rayos X, inactivación térmica, autoclavado o esterilización con plasma, dependiendo del material portador. Lo más preferido es que el portador se esterilice mediante radiación β o γ . En esta realización, es adecuada la radiación β con una dosis de 25 kgray usando un acelerador de electrones con 10 MeV. Hasta cierto punto, puede aplicarse esterilización con óxido de etileno al portador de la invención. En general, el método de esterilización debe elegirse con el fin de no dañar la actividad deseada del material biológico unido/inmovilizado sobre el portador sólido. Esto puede efectuarse con las biomoléculas tal como se definió anteriormente, en forma aislada, en complejo entre sí u otras biomoléculas o presentes en estructuras de orden superior tales como células o fragmentos de células. Para células vivas de cualquier tipo, hasta la fecha no se conocen medios adecuados de esterilización. Por tanto, las realizaciones en las que se usan células vivas como material biológico y el portador se esteriliza no son parte de esta invención.

55 Después de las etapas (b), (c), (d) o (e), el portador puede almacenarse hasta que sea necesario.

60 En otra realización, la presente invención se refiere a un portador sólido que se puede producir o producido mediante el método de la invención, en el que las biomoléculas son proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, ácidos grasos, polialcoholes y combinaciones o modificaciones de los mismos, en el que las proteínas preferiblemente son anticuerpos, enzimas, receptores, citocinas, hormonas, proteínas de membrana, factores de crecimiento, albúminas, globulinas, proteínas de transporte o factores de coagulación sanguínea, y en el que las biomoléculas se unen reversiblemente sobre dicho portador sólido y/o se unen directamente a dicho portador

sólido .

También se describe en el presente documento un portador sólido que tiene biomoléculas unidas al mismo, en el que dichas biomoléculas están parcial o completamente cubiertas por/incrustadas en la composición según la invención. Un ejemplo de un portador sólido de este tipo, también denominado “portador recubierto posteriormente”, que comprende biomoléculas incrustadas, se ejemplifica en la sección transversal representada en el esquema de la figura 1.

En relación con la presente invención, los términos “parcialmente cubierto” o “parcialmente incrustado” indican preferiblemente que al menos el 20% de las biomoléculas están cubiertas o incrustadas en la composición según la invención, preferiblemente al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99%.

Las definiciones y explicaciones proporcionadas en relación con la composición según los métodos de la invención y, entre otras cosas, relacionadas con biomoléculas, procedimientos de unión e incubación de materiales portadores o la esterilización se aplican cambiando lo que se tenga que cambiar al portador sólido de la invención. Además, las características superiores particulares del portador sólido de la presente invención se han descrito anteriormente en el presente documento en el contexto de la caracterización del método de la invención.

Según la invención, las biomoléculas que se unen al portador sólido son por ejemplo proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, ácidos grasos, polialcoholes y combinaciones o modificaciones de los mismos tal como se describió anteriormente. Las proteínas son preferiblemente anticuerpos, más preferiblemente anticuerpos de la clase IgG, IgY o IgM. Otras proteínas preferidas son citocinas, agonistas o antagonistas proteínicos distintos de anticuerpos tales como enzimas, factores de crecimiento, albúminas o globulinas, receptores, hormonas, proteínas de membrana, albúminas, globulinas, proteínas de transporte o factores de coagulación sanguínea.

En otra realización más preferida, las biomoléculas se unen específicamente a una proteína marcadora indicativa de una enfermedad, un patógeno, preferiblemente un patógeno no celular, una célula o una toxina. El término “se une específicamente”, usado de manera intercambiable con “interacciona específicamente con”, según la presente invención significa que la biomolécula no reacciona de manera cruzada o no lo hace esencialmente con otras estructuras o epítomos que los del patógeno o proteína marcadora indicativos de una enfermedad. Biomoléculas preferidas de esta realización son anticuerpos tal como se describió anteriormente. La reactividad cruzada de un panel de anticuerpos en investigación puede someterse a prueba, por ejemplo, evaluando la unión de dicho panel de anticuerpos en condiciones convencionales a la estructura/epítipo de interés, así como a varias estructuras/epítomos más o menos estrechamente relacionados (estructural y/o funcionalmente). Solo aquellos anticuerpos que se unen a la estructura/epítipo de interés en su contexto relevante (por ejemplo, un motivo específico en la estructura de una proteína indicativa de una enfermedad) pero que no se unen o no se unen esencialmente a ninguna de las otras estructuras/epítomos se consideran específicos para la estructura/epítipo de interés y, por tanto, pasan a ser anticuerpos que van a usarse según esta invención. Se describen los métodos correspondientes, por ejemplo, en Harlow y Lane, 1988 y 1999, loc. cit.

Los ejemplos de enfermedades para las que existen proteínas marcadoras incluyen hiperlipidemia grave de origen diverso, hipercolesterolemia familiar homocigota, hipercolesterolemia familiar heterocigota, Apo B-100 defectuosa, elevación de lipoproteína (a) aislada, lupus eritematoso sistémico (SLE), síndrome de Sjögren, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, cardiomiopatía dilatada (DCM), enfermedades asociadas con inhibidores de factores de coagulación, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), anemia hemolítica autoinmunitaria, síndrome de hiperviscosidad en hipergammaglobulinemia, miastenia grave, síndrome de Guillain-Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), polineuropatías disproteínicas, trasplante de médula ósea, orbitopatía endocrina, diabetes mellitus tipo I (IDDM), síndrome de Goodpasture, nefropatías debidas a depósitos de complejos inmunitarios o inmunoglobulinas, crioglobulinemia, pénfigo, dermatitis atópica, enfermedades de injerto contra huésped (GvH), enfermedades de huésped contra injerto (HvG) y diversas formas de vasculitis. Proteínas marcadoras bien conocidas para enfermedades específicas son por ejemplo procalcitonina, citocinas tales como TNF α o IL6, y proteína c reactiva. Los patógenos a los que pueden unirse las biomoléculas incluyen aquellos que provocan enfermedades infecciosas, tales como bacterias u hongos. Los patógenos no celulares que provocan enfermedades infecciosas incluyen virus y priones.

Ejemplos de tales agentes patógenos son VIH, VHB, VHC, virus del herpes tales como por ejemplo los virus del herpes simple, citomegalovirus y de la varicela zóster, bacterias Gram-positivas, por ejemplo estreptococos, estafilococos, bacterias Gram-negativas, por ejemplo *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

También toxinas pueden ser indicativas de una enfermedad o un determinado estado del cuerpo. Una toxina es una sustancia venenosa, producida preferiblemente por células u organismos vivos. Las toxinas pueden ser, por ejemplo, moléculas pequeñas, péptidos o proteínas que son capaces de provocar una enfermedad en contacto con o absorción por tejidos corporales interaccionando con macromoléculas biológicas tales como enzimas o receptores celulares. Las toxinas varían enormemente en cuanto a su gravedad, oscilando en habitualmente leves y agudas

(como en una picadura de abeja) y casi inmediatamente mortales (como en la toxina botulínica).

En otra realización preferida de la presente invención, el portador sólido recubierto posteriormente se esteriliza tal como se describió anteriormente para el uso y el método de la invención, por ejemplo, mediante irradiación beta o gamma. Es adecuada por ejemplo la irradiación beta con una dosis de 25 kGy usando un acelerador de electrones con 10 meV.

Los portadores sólidos según la presente invención pueden usarse en terapia y diagnóstico.

También se describe en el presente documento el uso de la composición según la invención para estabilizar portadores sólidos que tienen biomoléculas unidas a los mismos para almacenamiento a largo plazo y/o esterilización.

Un desafío importante en el almacenamiento a largo plazo y la esterilización de biomoléculas es evitar cambios irreversibles en biomoléculas que tienen una actividad biológica deseada. Estos cambios pueden dar como resultado modificaciones moleculares de las biomoléculas que se producen cuando estas últimas se ven sometidas a estrés, lo que da como resultado además una pérdida de la actividad biológica deseada de dichas biomoléculas, su estabilidad reducida tras el almacenamiento o nuevas propiedades inmunológicas/antigénicas que podrían poner a los destinatarios de tales productos en riesgo de padecer reacciones alérgicas tras la administración o aplicación. Esto es especialmente importante para proteínas que son de estructura compleja y/o bastante lábiles, como por ejemplo muchas proteínas terapéuticas y anticuerpos monoclonales.

Los investigadores han intentado evitar cambios irreversibles que pueden producirse en compuestos activos durante la esterilización usando óxido de etileno. Sin embargo, el óxido de etileno a menudo reacciona con proteínas. Además, debido a la toxicidad tisular conocida y al potencial carcinogénico de los subproductos del óxido de etileno, la Administración de Alimentos y Medicamentos ha establecido límites máximos de residuos para óxido de etileno y sus productos de reacción principales, etilenglicol y etilenclorhidrina. Una ventaja de la presente invención es que las biomoléculas están protegidas por la composición según la invención, de modo que la esterilización también puede efectuarse usando óxido de etileno.

A diferencia del óxido de etileno, la esterilización por radiación tiene las ventajas de una alta capacidad de penetración, una reactividad química relativamente baja y efectos instantáneos sin la necesidad de controlar la temperatura, la presión, el vacío o la humedad. La esterilización por radiación se usa ampliamente en la industria para una variedad de productos y tanto los niveles de dosificación como sus efectos biológicos se conocen bien. En general, se acepta que la esterilización por haz de electrones y radiación gamma son igualmente eficaces para destruir organismos microbianos.

Aunque es suficiente para destruir eficazmente microorganismos, la radiación generalmente altera la estructura de biomoléculas tales como proteínas, ADN, ARN, etc., haciéndolas biológicamente inactivas, si no están protegidas o estabilizadas. Por tanto, ha existido una necesidad significativa de una forma sencilla de esterilizar de manera eficaz y segura compuestos biológicamente activos sin afectar de manera perjudicial a sus propiedades químicas, físicas o fisiológicas. Esto se ha logrado según la presente invención.

La introducción de productos nuevos o modificados en el mercado médico requiere la garantía de que puedan almacenarse durante un período prolongado (de uno a cinco años) sin ninguna disminución en el rendimiento que pueda afectar a la seguridad y eficacia cuando se usan los productos. Debido a que habitualmente no existen muestras envejecidas a temperatura ambiente de período completo para tales productos, generalmente es necesario realizar pruebas de 'envejecimiento acelerado' para proporcionar datos experimentales que respalden las declaraciones de rendimiento y vida útil de almacenamiento de estos productos hasta que estén disponibles muestras de período completo.

El motivo principal de usar técnicas de envejecimiento acelerado en las pruebas de calificación de un dispositivo médico es llevar el producto al mercado lo antes posible. El objetivo es beneficiar tanto al paciente, por ejemplo, a través de la disponibilidad temprana de un dispositivo para mejorar la vida, como a la empresa, al generar ventas adicionales y cuotas de mercado, sin exponer a ninguno de los dos a ningún riesgo indebido.

El envejecimiento acelerado puede definirse como un procedimiento que busca determinar la respuesta de un dispositivo o material en condiciones de uso normal a lo largo de un tiempo relativamente largo, sometiendo el producto durante un tiempo mucho más corto a estreses que son más severos o que se aplican con más frecuencia que el estrés ambiental u operativo normal. Puede lograrse una mejora significativa en la eficiencia del plan de pruebas usando un estrés ambiental excesivo tal como calor, oxígeno, productos químicos o radiación.

Un enfoque simplificado para el envejecimiento acelerado se basa en someter a prueba a una sola temperatura acelerada y luego emplear la regla que establece que la velocidad de una reacción química aumentará en un factor Q_{10} por cada 10°C de aumento de temperatura. La relación típica seleccionada para polímeros médicos comúnmente usados es $Q_{10} = 2$; es decir, una duplicación de la velocidad de reacción por cada aumento de 10°C en

la temperatura por encima de la temperatura de uso o almacenamiento.

Con el fin de lograr una vida útil suficiente para biomoléculas que se usan para diagnóstico o terapia, estas biomoléculas tienen que congelarse para evitar su desnaturalización (Cleland *et al.*, (2001), Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 90, págs. 310-321). Además, las biomoléculas de interés tienen que incubarse en disoluciones estabilizantes que contienen los denominados lioprotectores tales como azúcares (por ejemplo, sacarosa, trehalosa, manitol) o sales. Sin embargo, debido al riesgo de que las biomoléculas se desnaturalicen por congelación, existe la necesidad de métodos de almacenamiento a 4°C o a temperatura ambiente, especialmente para biomoléculas inestables como por ejemplo anticuerpos de IgM.

Sorprendentemente, se descubrió que al incubar biomoléculas, por ejemplo, anticuerpos, inmovilizados sobre un portador sólido en la composición estabilizante según la presente invención, estas biomoléculas pueden almacenarse hasta 7 días a 45°C sin pérdida significativa de su actividad biológica. Según la regla descrita anteriormente, este “envejecimiento acelerado” es igual a un almacenamiento de 16 semanas a 5°C. Además, las biomoléculas pueden esterilizarse sin una pérdida significativa de su actividad biológica (véanse los ejemplos adjuntos).

También se describen en el presente documento productos y dispositivos médicos y de diagnóstico que comprenden el portador de la invención. En una realización alternativa adicional, la presente invención proporciona el uso de un portador sólido de la invención para la preparación de productos y/o dispositivos médicos o de diagnóstico. Tales dispositivos que son una combinación del componente biológico que comprende las biomoléculas estabilizadas según la invención y una parte no biológica también se denominan producto de combinación de parte biológica-dispositivo.

Los portadores sólidos que tienen biomoléculas unidas a los mismos que están incrustados/cubiertos por la composición estabilizante según la presente invención pueden usarse en una variedad de aplicaciones de diagnóstico y médicas/terapéuticas. Las aplicaciones o dispositivos terapéuticos incluyen implantes médicos, catéteres, endoprótesis, tubos, solos o en combinación con otros componentes, matrices capaces de eluir las biomoléculas unidas al humedecerlas con un líquido tal como un líquido corporal, por ejemplo, apósitos de heridas o dispositivos médicos usados en circulación extracorpórea. Las aplicaciones de diagnóstico comprenden, por ejemplo, inmunoensayos como ELISA (ensayos de inmunosorción ligados a enzimas), chips de proteínas, ensayos de múltiples analitos, inmunotransferencias de tipo Western, transferencias de puntos, inmunohistoquímica, ensayos de receptor-ligando e inmuno-PCR.

Los enfoques terapéuticos pueden comprender aplicaciones *in vivo*, así como *ex vivo*, del portador de la invención en el contexto de un dispositivo médico. Por consiguiente, un dispositivo que comprende el portador sólido recubierto posteriormente puede implantarse en un paciente para una aplicación *in vivo*. Para una aplicación *ex vivo*, un dispositivo que comprende el portador recubierto sólido puede conectarse con la circulación de un líquido corporal que va a tratarse. La sangre derivada de una arteria o una vena de un paciente puede conducirse por ejemplo a través de tal dispositivo y posteriormente canalizarse nuevamente al paciente (conexión con el torrente sanguíneo). Alternativamente, pueden incubarse muestras de un fluido corporal con el portador *in vitro*. En una etapa posterior de este último tratamiento, el fluido corporal puede reintroducirse en el cuerpo de un paciente.

Una realización del dispositivo médico es adecuada para permitir un contacto, filtrado o limpieza de fluidos corporales como por ejemplo sangre, linfa o líquido cefalorraquídeo de un paciente, por ejemplo, conectando el dispositivo con la circulación del fluido corporal de un paciente y tratando de ese modo a un paciente tal como se describió en el presente documento anteriormente. Además, el dispositivo puede ser adecuado para la detección cualitativa o cuantitativa de compuestos, así como para atrapar determinadas células o poblaciones de células, por ejemplo, células madre, células fetales o células tumorales, en una muestra de un fluido corporal de un paciente tal como también se describe en parte en el presente documento a continuación. Las células madre comprenden células madre pluripotentes, multipotentes o totipotentes. En general, diferentes líneas celulares, especies celulares o estadios de desarrollo de las células pueden distinguirse por la presencia de diferentes antígenos en la superficie celular. Esto permite el atrapamiento selectivo de las células deseadas eligiendo una biomolécula tal como un anticuerpo o fragmento del mismo unido al portador de la invención, en el que dichas biomoléculas se unen específicamente a uno de dichos antígenos. En el caso de atrapar células fetales, la aplicación del dispositivo de la invención evita técnicas potencialmente peligrosas como la amniocentesis, ya que se usa una muestra de sangre obtenida de la madre para atrapar células fetales sin poner en peligro la vida del feto. Además, el diagnóstico de una enfermedad cancerosa y su caracterización se facilita mediante la provisión de muestras de células tumorales enriquecidas.

El término “paciente”, tal como se usa a lo largo de toda la presente invención, comprende sujetos enfermos o con enfermedad, así como sujetos sanos. Un paciente según la presente invención es cualquier persona que recibe atención, cuidado o tratamiento médico. La mayoría de las veces, pero no siempre, la persona está enferma o lesionada y, si lo está, necesita tratamiento por parte de un médico u otro profesional médico. En otros términos, el término “paciente” se usa de manera intercambiable con “sujeto” que puede estar enfermo o no. El sujeto puede ser un animal, preferiblemente un mamífero, lo más preferiblemente un ser humano. Según lo anterior, un paciente

también es, por ejemplo, un ser humano sano al que, de forma aguda o de rutina, se le diagnostica una enfermedad o estado de salud. En otros términos, la invención puede usarse para descubrir si un paciente padece una determinada enfermedad (o una combinación de enfermedades), es propenso a desarrollar una enfermedad de este tipo o una combinación de las mismas o no.

5 El dispositivo puede incluir implantes transitorios o permanentes caracterizados por una superficie que corresponde, al menos en parte, a un portador recubierto sólido de la invención o a la que se unen los portadores recubiertos sólidos de la invención. Esto incluye dispositivos de osteosíntesis, materiales usados para cirugía reconstructiva, etc., así como clases novedosas de endoprótesis. Tales clases novedosas de endoprótesis pueden tener
10 características catalizadoras (por ejemplo, características estimuladoras, inhibitorias o de eliminación). En este sentido, una característica estimuladora a modo de ejemplo podría ser un anticuerpo unido a un portador o fragmento del mismo que reticula receptores en una superficie celular y que puede activar células tales como leucocitos. Una característica inhibitoria a modo de ejemplo es un anticuerpo unido a un portador o fragmento del mismo que se une a receptores en la superficie celular y que puede inactivar células o bien induciendo señales de inactivación (por ejemplo, que afectan a leucocitos) o bien impidiendo la unión de una molécula activadora. Un
15 ejemplo para una característica de eliminación es un anticuerpo unido a un portador o fragmento del mismo que puede unirse a factores solubles y así reducir su concentración en la disolución, por ejemplo, agotar dichos factores (por ejemplo, Ig-Therasorb® o LDL-Therasorb®).

20 Además, otros ejemplos alternativos del dispositivo médico o de diagnóstico son dispositivos cuyas paredes interiores son portadores recubiertos sólidos de la invención o a las que se unen los portadores recubiertos sólidos de la presente invención. Tales dispositivos incluyen, pero no se limitan a, recipientes de vacunación *ex vivo*, dispositivos de aféresis, dispositivos de aislamiento de células madre, dispositivos de purga, jeringas y dispositivos para el almacenamiento de sangre transitorio o permanente (por ejemplo, en bancos de sangre, pero también
25 equipos de laboratorio en laboratorios de investigación de rutina). Un ejemplo de un dispositivo de diagnóstico (médico) es una placa de ELISA en la que la superficie de la placa (o al menos de los pocillos de reacción) corresponde, al menos en parte, a un portador recubierto sólido de la invención o que tiene unida a la misma los portadores recubiertos sólidos de la presente invención.

30 También se describe en el presente documento un recipiente esterilizado, que comprende un portador, al menos una biomolécula unida reversiblemente al portador, la composición estabilizante según la invención que cubre parcial o completamente las biomoléculas unidas; y opcionalmente una tapa. Las biomoléculas que pueden unirse al portador se han descrito anteriormente. La al menos una biomolécula puede unirse al portador de manera que puede liberarse rápidamente del portador, preferiblemente inmediatamente antes de su uso. Dependiendo del tipo de unión,
35 covalente o no covalente, puede obtenerse una liberación rápida, por ejemplo, por escisión proteolítica, cambios en el valor del pH o la temperatura. El portador puede ser sólido, preferiblemente poroso. Además, el portador puede ser semisólido y preferiblemente puede comprender un hidrogel o una mezcla proteica gelatinosa. Aún más, el portador puede ser soluble y puede comprender preferiblemente estructuras proteínicas y/o de hidratos de carbono que se disuelven en disoluciones acuosas, opcionalmente tamponadas.

40 También se describe en el presente documento un método para producir un recipiente esterilizado para biomoléculas, que comprende: (a) insertar un portador en un recipiente; (b) unir reversiblemente al menos una biomolécula a dicho portador; (c) incubar el portador con la al menos una biomolécula unida reversiblemente en la composición estabilizante líquida según la invención, de manera que la al menos una biomolécula se cubre parcial o
45 completamente por dicha composición estabilizante; (d) sellar el recipiente; y (e) esterilizar el recipiente. Alternativamente, también se describe en el presente documento un método para producir un recipiente esterilizado para biomoléculas, que comprende: (a) unir reversiblemente al menos una biomolécula a un portador, (b) insertar el portador con la al menos una biomolécula unida en un recipiente, (c) incubar dicho portador con la al menos una biomolécula unida reversiblemente en la composición estabilizante líquida según la invención, de manera que la al
50 menos una biomolécula se cubre parcial o completamente por dicha composición estabilizante, (d) sellar el recipiente; y (e) esterilizar el recipiente.

Además, también se describe en el presente documento un método para producir un recipiente esterilizado para biomoléculas, que comprende: (a) unir reversiblemente al menos una biomolécula a un portador, (b) incubar el
55 portador con la al menos una biomolécula unida reversiblemente en la composición estabilizante líquida según la invención, de manera que la al menos una biomolécula se cubre parcial o completamente por dicha composición estabilizante, (c) insertar el portador con la al menos una biomolécula unida reversiblemente en un recipiente, (d) sellar el recipiente; y (e) esterilizar el recipiente.

60 Los métodos anteriores pueden comprender además una etapa de secado o eliminación de la parte líquida de la composición después de la incubación tal como se describió anteriormente.

También se describe en el presente documento un recipiente producido mediante el método de la presente invención.

65 Además, también se describe en el presente documento el uso de un recipiente de la invención para aplicaciones de

diagnóstico o terapéuticas tal como se describió anteriormente.

En una realización adicional, la invención proporciona un método para diagnosticar una enfermedad que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra obtenida de un paciente con un portador sólido de la invención en condiciones adecuadas para permitir la unión específica de las biomoléculas unidas al portador que se unen específicamente a una proteína marcadora indicativa de una enfermedad, un patógeno preferiblemente no celular, una célula o una toxina a dicho patógeno o proteína marcadora o célula o toxina; y

(b) detectar si dicha proteína marcadora indicativa de la enfermedad, dicho patógeno preferiblemente no celular, dicha célula o dicha toxina se ha unido a las biomoléculas.

Las muestras incluyen líquidos o fluidos corporales tales como sangre, plasma, suero, saliva, orina, líquido broncoalveolar, secreción estomacal e intestinal, líquido cefalorraquídeo, ascitis, derrame pleural, exudado de heridas.

Las condiciones adecuadas para permitir la unión específica de las biomoléculas unidas al portador que se unen específicamente a un patógeno o proteína marcadora indicativa de una enfermedad a dicho patógeno o proteína marcadora incluyen un valor de pH de entre 7,0 y 7,7 y una osmolaridad de 200 a 400 mosmol/l.

Anteriormente se han descrito biomoléculas preferidas. Las biomoléculas particularmente preferidas comprenden biomoléculas unidas a la membrana e intracelulares tales como receptores, así como biomoléculas solubles o receptores o fragmentos funcionales de los mismos. Los fragmentos funcionales preferidos de biomoléculas unidas a la membrana contienen la porción intracelular o extracelular de dichas biomoléculas, omitiendo así su fracción transmembrana. Preferiblemente, la biomolécula o receptor es un anticuerpo o un fragmento o derivado del mismo que retiene su actividad de unión y especificidad tal como se describió anteriormente. Lo más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

Los ejemplos de enfermedades que van a diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención comprenden las enfermedades descritas anteriormente en el presente documento. El patógeno o la proteína marcadora mencionada puede detectarse por ejemplo mediante el uso de anticuerpos como por ejemplo anti-p24 (VIH) (véanse por ejemplo Schupbach *et al.*, J. Acquir. Immune Defic. Syndr. (2005), vol. 40, págs. 250-256) o anti-IgB (HCMV) (véase por ejemplo Just-Nubling G. *et al.*, Infection (2003), 318-323).

Las condiciones adecuadas para la unión específica de un patógeno o proteína marcadora indicativa de la enfermedad al anticuerpo unido pueden lograrse poniendo en contacto una muestra del líquido corporal del paciente con portadores sólidos de la invención cubiertos con anticuerpos en condiciones fisiológicas. Las condiciones fisiológicas incluyen un valor de pH de entre 7,0 y 7,7 y una osmolaridad de 200 a 400 mosmol/l.

La detección de si el patógeno o la proteína marcadora indicativa de la enfermedad se ha unido a las biomoléculas puede efectuarse mediante métodos bien conocidos en la técnica y descritos anteriormente. Los métodos a modo de ejemplo comprenden ELISA e inmunoprecipitación.

En una realización preferida, el método de diagnóstico de la invención comprende la etapa de incubar el material de una muestra del líquido corporal en condiciones de cultivo celular con el fin de enriquecer un patógeno no celular tal como un virus, células tales como una bacteria o un patógeno eucariota unicelular antes de poner en contacto la muestra con el portador de la invención (etapa (a)). Las condiciones de cultivo celular incluyen un valor de pH de entre 7,0 y 7,7 y una osmolaridad de 200 a 400 mosmol/l en un medio de cultivo a 25 hasta 40°C.

Además, también se describe en el presente documento una composición de diagnóstico que comprende un portador recubierto sólido que está recubierto posteriormente según la presente invención. La composición de diagnóstico de la invención se usará preferiblemente para el diagnóstico de una enfermedad usando los métodos descritos anteriormente en el contexto de la detección de proteínas marcadoras, preferiblemente no celulares, patógenos, células y toxinas.

Los ejemplos de enfermedades que van a diagnosticarse con la composición de diagnóstico de la invención se han descrito anteriormente en el presente documento.

También se describe en el presente documento un kit para la estabilización de biomoléculas inmovilizadas. El kit incluye (a) al menos una composición estabilizante descrita en el presente documento y (b) instrucciones para poner en contacto biomoléculas inmovilizadas con una cantidad eficaz de al menos una composición estabilizante para producir una composición de biomoléculas estabilizadas.

Los componentes estabilizantes pueden incluir uno o más materiales sólidos (por ejemplo, reactivos liofilizados o en polvo u otros compuestos que se conocen en el estado de la técnica).

Los diversos componentes del kit pueden envasarse en uno o más recipientes, tales como uno o más viales. Los viales pueden comprender, además de los componentes, conservantes o tampones para el almacenamiento.

5 Las figuras muestran:

Figura 1: una biomolécula, por ejemplo, un anticuerpo se une a un portador sólido, preferiblemente mediante el uso de moléculas espaciadoras o ligadoras. El anticuerpo se incrusta mediante la disolución de recubrimiento posterior y de ese modo se protege de las influencias del estrés como la irradiación.

10 Figuras 2 y 3: el efecto protector de los recubrimientos posteriores de aminoácidos aumenta con el número de aminoácidos diferentes usados (independientemente del aminoácido). Los aminoácidos se seleccionaron como representantes de los siguientes grupos: aminoácidos con cadena lateral aromática/cargada positivamente/cargada negativamente/polar no cargada/no polar alifática. Con recubrimientos posteriores que consisten en 5 aminoácidos diferentes después de la irradiación con 25 kGy aprox., se mantiene el 65% de la capacidad de unión a antígeno en comparación con el control no irradiado; después del procedimiento de envejecimiento acelerado (7 días a 45°C) se mantiene aprox. el 85% de la capacidad de unión a antígeno en comparación con el control sin tratar.

20 Figuras 4 y 5: el efecto protector de los recubrimientos posteriores de aminoácidos no puede mejorarse adicionalmente aumentando el número de aminoácidos por encima de 5. Después de la irradiación con 25 kGy, se mantiene aproximadamente el 70% de la capacidad de unión a antígeno en comparación con el control sin tratar conteniendo todos los recubrimientos posteriores más de 5 aminoácidos; después del envejecimiento acelerado (7 días a 45°C) se mantiene aproximadamente el 85%.

25 Figuras 6 y 7: la combinación de aminoácidos muestra un efecto protector del 65% (4 aminoácidos), respectivamente del 85% (8 aminoácidos), mientras que el efecto promedio de los aminoácidos individuales es del 22% (4 aminoácidos), respectivamente del 33% (8 aminoácidos) de la capacidad de unión a antígeno en comparación con el control sin esterilizar. El efecto máximo de los aminoácidos individuales es del 28% (4 aminoácidos), respectivamente del 55% (8 aminoácidos).

30 Figura 8: la adición de ácido glicirrónico 1 mM a los recubrimientos posteriores de aminoácidos mejora el efecto protector de todos los recubrimientos posteriores hasta un valor máximo del 70-80% (capacidad de unión a antígeno en comparación con el control no irradiado).

35 Figura 9: un recubrimiento posterior de aminoácidos que consiste en cinco aminoácidos diferentes (200 mM) y ácido glicirrónico 1 mM muestra un efecto protector de 80% de la capacidad de unión a antígeno en comparación con el control sin tratar después de la irradiación (25 kGy) y del 85% después del procedimiento de envejecimiento acelerado, respectivamente. Un recubrimiento posterior que consiste en albúmina y manitol muestra solo el 65% de actividad restante después de la irradiación (25 kGy). Después del envejecimiento acelerado durante 7 días a 45°C, casi no queda actividad con albúmina y manitol, similar a los controles sin ningún recubrimiento posterior.

40 Figura 10: se usó una mezcla de 18 aminoácidos para bloquear la unión inespecífica a una placa de ELISA sin inhibir las interacciones antígeno-anticuerpo específicas. La eficiencia de bloqueo es comparable a bloqueos con albúmina convencional.

45 Figura 11: un recubrimiento posterior de aminoácidos que consiste en 18 aminoácidos diferentes (20 g/l) y ácido glicirrónico 0,25 mM muestra un efecto protector del 83% de la actividad ADNasa en comparación con el control sin tratar después de la irradiación (25 kGy). Un recubrimiento posterior que consiste en albúmina y manitol muestra un 95% de actividad restante después de la irradiación (25 kGy).

50 Figura 12: un recubrimiento posterior de aminoácidos que consiste en 18 aminoácidos diferentes (20 g/l en PBS) muestra un efecto protector del 85% de la capacidad de unión a antígeno en comparación con el control sin tratar después de la irradiación (25 kGy) y del 90% después del procedimiento de envejecimiento acelerado, respectivamente. Con la adición de ácido glicirrónico 1 mM al recubrimiento posterior de aminoácidos, el efecto protector es del 92% de la capacidad de unión a antígeno en comparación con el control sin tratar después de la irradiación (25 kGy) y del 95% después del procedimiento de envejecimiento acelerado, respectivamente.

55 Figura 13: recubrimientos posteriores de aminoácidos que consisten en 18 aminoácidos diferentes (20 g/l en PBS) muestran un efecto protector del 55-60%. Sin recubrimiento posterior, la cantidad de ADNbc intacto se reduce hasta el 20%, con albúmina y manitol se conserva el 85%.

Figura 14: prueba antihepatitis A (ELISA funcional) de una composición de aminoácidos usada para proteger anticuerpos anti-hepatitis después de la liofilización y esterilización.

65 Figura 15: la clase estructural de saponinas tiene el potencial de mejorar el efecto protector de las combinaciones de aminoácidos.

Figura 16: combinaciones de al menos 3 aminoácidos y las combinaciones de 2 aminoácidos con la adición de ácido glicirrónico proporcionan una protección máxima de un anticuerpo inmovilizado cuando se esteriliza con 50 kGy de irradiación beta.

Figura 17: la composición de aminoácidos proporciona protección en diferentes condiciones de estrés. Se proporciona la mejor protección para la irradiación beta con diferentes dosis y envejecimiento artificial a temperatura elevada. La protección para la irradiación gamma o la esterilización con óxido de etileno es menor pero todavía relevante.

Figuras 18 y 19: recubrimientos posteriores de aminoácidos que contienen al menos 5 aminoácidos proporcionan protección durante el almacenamiento prolongado. Para las muestras no esterilizadas, después de 62 días a 45°C se conserva aproximadamente el 80% de la capacidad de unión a antígeno. Las muestras esterilizadas (beta, 25 kGy) mantienen aproximadamente el 70% de su capacidad de unión a antígeno después de 62 días a 45°C. Recubrimientos posteriores de aminoácidos que contienen solo 2 aminoácidos mantienen solo un 40% de la capacidad de unión a antígeno durante el proceso de almacenamiento, independientemente de la esterilización. Sin el recubrimiento posterior, solo se conserva el 20-30% de la actividad.

Figuras 20 y 21: la adición de ácido glicirrónico 1 mM a las disoluciones de recubrimiento posterior refuerza el efecto protector. Recubrimientos posteriores de aminoácidos que contienen al menos 5 aminoácidos y ácido glicirrónico proporcionan protección durante el almacenamiento prolongado. Para las muestras no esterilizadas, después de 62 días a 45°C se conserva aproximadamente el 90% de la capacidad de unión a antígeno. Las muestras esterilizadas (beta, 25 kGy) mantienen aproximadamente el 80% de su capacidad de unión a antígeno después de 62 días a 45°C. Recubrimientos posteriores de aminoácidos que contienen 2 aminoácidos y ácido glicirrónico mantienen aproximadamente el 70% de la capacidad de unión a antígeno durante el proceso de almacenamiento, independientemente de la esterilización. Sin recubrimiento posterior, solo se conserva el 20-30% de la actividad.

Figura 22: las muestras esterilizadas con irradiación gamma mantienen aproximadamente el 85% de la actividad cuando se protegen con un recubrimiento posterior de aminoácidos que contiene 18 aminoácidos; este efecto no se mejora adicionalmente con ácido glicirrónico; con 5 aminoácidos la actividad restante es del 75%; con 2 aminoácidos solo se mantiene el 40%. La protección con 2 aminoácidos se mejora mediante la adición de ácido glicirrónico, en este caso la actividad restante es del 65%. Las muestras esterilizadas con ETO mantienen aproximadamente el 85% de la actividad cuando se protegen con un recubrimiento posterior de aminoácidos que contiene 18 aminoácidos; este efecto no se mejora adicionalmente con ácido glicirrónico. Recubrimientos posteriores que contienen 5 o 2 aminoácidos tienen poco efecto protector; la adición de ácido glicirrónico mejora la protección marginalmente.

Figura 23: recubrimiento posterior con aminoácidos de aminoácidos, dipéptidos o mezclas de los mismos, opcionalmente junto con ácido glicirrónico.

Figura 24: se muestra un ejemplo donde el propio vial es el portador. En primer lugar, la biomolécula se unió al portador mediante secado. Posteriormente, se añadió la disolución de estabilizador y también se secó. La biomolécula (en este caso interleucina 8 = IL8) pierde la mayor parte de su función biológica durante la esterilización posterior (irradiación de 25 kGy) si no se añade estabilizador. En cambio, una disolución de estabilizador con aminoácidos diferentes protegió la biomolécula. Se muestra la actividad quimiotáctica de IL8 sobre granulocitos neutrófilos humanos.

Figura 25: se muestra un ejemplo donde el propio vial es el portador. En primer lugar, la biomolécula se unió al portador mediante secado. Posteriormente, se añadió la disolución de estabilizador y también se secó. La biomolécula (en este caso interleucina 8 = IL8) pierde la mayor parte de su función biológica durante el almacenamiento acelerado (45°C) si no se añade estabilizador. En cambio, una disolución de estabilizador con aminoácidos diferentes protegió la biomolécula. Se muestra la actividad quimiotáctica de IL8 sobre granulocitos neutrófilos humanos.

Figura 26: se muestra un ejemplo donde el propio vial es el portador. En primer lugar, la biomolécula se unió al portador mediante secado. Posteriormente, se añadió la disolución de estabilizador y también se secó. La biomolécula (en este caso ADNbc) pierde parte de su función biológica durante la esterilización posterior (irradiación de 25 kGy) si no se añade estabilizador. En cambio, una disolución de estabilizador con aminoácidos diferentes protegió la biomolécula. Se muestra la cantidad de ADN detectable en porcentaje del valor inicial.

Figura 27: se muestra un ejemplo donde el propio estabilizador es el portador. La biomolécula y la disolución de estabilizador se añadieron y se secaron juntas. La biomolécula (en este caso interleucina 8 = IL8) pierde la mayor parte de su función biológica durante la esterilización posterior (irradiación de 25 kGy) si no se añade estabilizador. En cambio, una disolución estabilizadora con aminoácidos diferentes protegió la biomolécula. Se muestra la actividad quimiotáctica de IL8 sobre granulocitos neutrófilos humanos.

Figura 28: se muestra un ejemplo, donde el propio estabilizador es el portador. La biomolécula y la disolución de

estabilizador se añadieron y se secaron juntos. La biomolécula (en este caso un anticuerpo anti-IgG de ratón) pierde la mayor parte de su función biológica durante el posterior almacenamiento y/o esterilización (irradiación de 25 kGy) si no se añade estabilizador. En cambio, una disolución de estabilizador con diferentes aminoácidos protegió la biomolécula. Se muestra la unión específica al antígeno.

5
Figura 29: influencia de diferentes soluciones de desorción sobre la actividad biológica de una biomolécula (en este caso un anticuerpo anti-IgG de ratón). Con la excepción de H₂SO₄ 0,5 M, ninguna de las otras disoluciones de desorción sometidas a prueba en este experimento tuvo una influencia significativa sobre la actividad biológica de la biomolécula. Se muestra la unión específica al antígeno.

10
Figura 30: la desorción de una biomolécula (en este caso un anticuerpo anti-IgG de ratón) se somete a prueba después de que la biomolécula se uniera a una espuma de poliuretano de poro abierto (proveedor A, poros grandes). Mientras que tampón de citrato pH 4,75 y NaCl 1 M solo desorbieron pequeñas cantidades de la biomolécula, pudo desorberse significativamente más biomolécula con NaCl 1 M + imidazol 0,02 M y disolución salina tamponada con fosfato, respectivamente. Se muestra la unión específica al antígeno.

15
Figura 31: la desorción de una biomolécula (en este caso un anticuerpo anti-IgG de ratón) se somete a prueba después de que la biomolécula se uniera a una espuma de poliuretano de poro abierto (proveedor B, poros más pequeños). Tampón citrato pH 4,75 y disolución salina tamponada con fosfato desorbieron un poco mejor que NaCl 1 M con o sin imidazol 0,02 M. Se muestra la unión específica al antígeno.

20
Figura 32: la desorción de una biomolécula (en este caso un anticuerpo anti-IgG de ratón) se somete a prueba después de que la biomolécula se uniera a una espuma de poliuretano de poro abierto (proveedor Smith & Nephews, poros pequeños). La biomolécula (en este caso un anticuerpo anti-IgG de ratón) pierde la mayor parte de su función biológica durante el posterior almacenamiento y/o esterilización (irradiación de 25 kGy) si no se añade estabilizador. En cambio, una disolución de estabilizador con diferentes aminoácidos protegió la biomolécula. La recuperación del anticuerpo es casi del 100% (5 µg/ml). Se muestra la unión específica al antígeno.

25
Figura 33: la desorción de una biomolécula (en este caso un anticuerpo anti-IgG de ratón) se somete a prueba después de que la biomolécula se uniera a un hidrogel de PVA. La biomolécula pierde la mayor parte de su función biológica durante el almacenamiento posterior y o la esterilización (irradiación de 25 kGy) si no se añade estabilizador. En cambio, una disolución de estabilizador con diferentes aminoácidos protegió la biomolécula. La recuperación del anticuerpo eluido es muy alta. Se muestra la unión específica al antígeno.

30
Figura 34: estructuras químicas de ejemplos para ligadores escindibles

Los ejemplos ilustran la invención.

35
Materiales y métodos

Todos los experimentos se basaron en el mismo diseño de ensayo ELISA básico.

40
Adsorción de LO-MM-3 a una placa de ELISA y aplicación de recubrimientos posteriores

45
Se adsorbió un anticuerpo monoclonal LO-MM-3 (anti-IgM de ratón, Acris, SM1495P) a la superficie de una placa de ELISA de 96 pocillos (Greiner Bio-one, 655061). Se diluyó LO-MM-3 en PBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺, PAA, H15-002) hasta una concentración de 2 µg/ml. Se pipetearon 100 µl de la disolución de anticuerpos a cada pocillo y se incubó durante la noche a 5°C. Se lavó la placa 2 veces con tampón de lavado (concentrado 25x, Invitrogen, WB02).

50
Se pipetearon 200 µl de cada composición estabilizante sometida a ensayo (recubrimiento posterior) por pocillo. Al menos 4 pocillos se trataron idénticamente con el mismo recubrimiento posterior para calcular medias y desviaciones estándar en el siguiente análisis. Se incubó la placa con las disoluciones de recubrimiento posterior durante 1 hora a temperatura ambiental. Se desecharon los recubrimientos posteriores y se secó la placa a temperatura ambiental durante al menos 1 hora.

55
Aminoácidos usados para los recubrimientos posteriores: L-alanina (Sigma-Aldrich, A7627), L-arginina (Sigma-Aldrich, A5131), L-asparagina (Sigma-Aldrich, A0884), L-aspartato (Sigma-Aldrich, A9256), L-cisteína (Sigma-Aldrich, 1276), L-glutamina (AppliChem, A1420), L-glutamato (Sigma-Aldrich, G1251), glicina (Merck, 1042010), L-histidina (Sigma-Aldrich, H8125), L-isoleucina (Sigma-Aldrich, 12752), L-leucina (Sigma-Aldrich, L8000), L-lisina (Sigma-Aldrich, L5626), L-metionina (Sigma-Aldrich, M9625), L-fenilalanina (Sigma-Aldrich, P2126), L-prolina (Sigma-Aldrich, P0380), L-serina (Sigma-Aldrich, S4500), L-treonina (Sigma-Aldrich, T8625), L-triptófano (Sigma-Aldrich, T0254), L-tirosina (Sigma-Aldrich, T3754), L-valina (Sigma-Aldrich, V0500)

60
Exposición a estrés de la superficie recubierta

65
Se expusieron tres placas tratadas idénticamente a diferentes condiciones ambientales. Se esterilizó una placa

mediante irradiación (beta, 25 kGy). La irradiación se realizó en Beta-Gamma-Service, Bruchsal, Alemania. Se trató una placa con un procedimiento de envejecimiento acelerado (7 días a 45°C). Basándose en una simplificación de la ecuación de Arrhenius, se supone que al aumentar la temperatura de almacenamiento en 10°C, la velocidad de reacción, es decir el envejecimiento, se duplica (Hemmerich, 1998: General Aging Theory and Simplified Protocol for Accelerated Aging of Medical Devices). Esto implica que un envejecimiento acelerado durante 7 días a 45°C es igual a un envejecimiento en tiempo real de 16 semanas de almacenamiento enfriado (5°C).

Una placa idéntica sin exposición a estrés sirvió como control en cada experimento. El efecto protector se calculó como la funcionalidad de anticuerpo restante tras condiciones de estrés en comparación con el control sin tratar.

$$\text{funcionalidad (\%)} = \frac{\text{placa con estrés} \cdot 100}{\text{placa de control}}$$

Detección por ELISA de la funcionalidad de LO-MM-3

Los recubrimientos posteriores secados se retiraron de los pocillos lavando la placa 3 veces. La placa de ELISA se bloqueó pipeteando 300 µl de disolución de bloqueo (albúmina 10 g/l PBS) a cada pocillo e incubando durante 1 hora a temperatura ambiental. Se lavó la placa 3 veces.

El antígeno para LO-MM-3, CH11 (IgM de ratón, MBL, SY001), se diluyó hasta 125 ng/ml y se pipetearon 200 µl de la disolución de antígeno a cada pocillo. Se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiental y se lavó 3 veces.

Se detectó el antígeno unido mediante un anticuerpo de detección LO-MM-9 (anti-IgM de ratón biotinilado, AbD serotec, MCA199B), que se diluyó con PBS hasta 50 ng/ml. A cada pocillo se le añadieron 200 µl y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiental. Se lavó la placa 3 veces.

Se diluyó estreptavidina (marcada con peroxidasa del rábano (HRP), Pierce, 21126) con PBS hasta 100 ng/ml. Se añadieron 200 µl a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiental. Se lavó la placa 3 veces.

Una disolución de sustrato de ELISA lista para usar para HRP (TMB = tetrametilbencidina, Invitrogen, 00-2023) se diluyó 1:2 con agua dest. y se pipetearon 200 µl a cada pocillo. Se incubó la placa durante 20 minutos a temperatura ambiental y se protegió de la luz. Para detener la reacción de color, a cada pocillo se le añadieron 50 µl de H₂SO₄ (diluido 1:5 con agua dest., Merck, 1007311000). Se detectó el color amarillo resultante midiendo la absorción a una longitud de onda de 450 nm (Fusion Photometer A 153601, PerkinElmer).

Ejemplo 1: Recubrimientos posteriores que consisten en al menos 5 aminoácidos muestran una protección máxima frente al estrés.

Experimento:

Se disolvieron los aminoácidos en o bien NaOH 0,5 M (Merck, 106482) o bien HCl 0,5 M (Merck, 100319) para obtener disoluciones madre con una concentración máxima. Las disoluciones madre de aminoácidos se mezclaron entre sí para conseguir una concentración de aminoácidos total de 200 mM en la disolución de recubrimiento posterior. Se usaron los aminoácidos en razón equimolar (2 aminoácidos: 2 x 100 mM; 3 aminoácidos: 3 x 67 mM; 4 aminoácidos: 4 x 50 mM, 5x40 mM; etc.)

El pH de las mezclas de aminoácidos se estableció a aproximadamente 7,0; y las mezclas se diluyeron adicionalmente en PBS para conseguir la concentración final de 200 mM.

Se realizaron la adsorción de LO-MM-3 a la placa y la aplicación del recubrimiento posterior; la esterilización y el envejecimiento acelerado; así como el procedimiento de ELISA general tal como se describió en la sección de materiales y métodos.

Resultados:

Tal como se muestra en la figura 2 y 3, el efecto protector de recubrimientos posteriores de aminoácidos aumenta con el número de aminoácidos diferentes usados. Los aminoácidos se seleccionaron como representantes de los siguientes grupos: aminoácidos con cadena lateral aromática/cargada positivamente/cargada negativamente/polar no cargada/no polar alifática. No es esencial usar aminoácidos particulares; pueden sustituirse con un aminoácido diferente del mismo grupo, o con características similares respectivamente (Tailor, 1985: The Classification of Amino Acid Conservation).

5 Con recubrimientos posteriores que consisten en 5 aminoácidos diferentes después de la irradiación con 25 kGy, se mantiene aproximadamente el 65% de la capacidad de unión a antígeno en comparación con el control sin irradiar (figura 1); después del procedimiento de envejecimiento acelerado (7 días a 45°C) se mantiene aproximadamente el 85% de la capacidad de unión a antígeno en comparación con el control sin tratar (figura 2).

10 El efecto protector de recubrimientos posteriores de aminoácidos no puede mejorarse adicionalmente aumentando el número de aminoácidos por encima de 5. Tal como se muestra en las figuras 4 y 5, recubrimientos posteriores con 8, 10 o incluso 18 aminoácidos tienen prácticamente el mismo efecto.

10 Ejemplo 2: La combinación de aminoácidos revela un efecto protector no atribuido a un único aminoácido particular.

Experimento:

15 Se disolvieron los aminoácidos en o bien NaOH 0,5 M (Merck, 106482) o bien HCl 0,5 M (Merck, 100319) para obtener disoluciones madre con una concentración máxima. Las disoluciones madre de aminoácidos se mezclaron entre sí para conseguir una concentración de aminoácidos total de 200 mM en la disolución de recubrimiento posterior. Se usaron los aminoácidos en razón equimolar (4 aminoácidos: 4 x 50 mM; 8 aminoácidos: 8 x 25 mM). Para las disoluciones de un único aminoácido, se disolvieron los aminoácidos en agua dest. a la concentración soluble máxima, si es posible 400 mM. El pH de todas las disoluciones de recubrimiento posterior se estableció a aproximadamente 7,0. Concentraciones de los aminoácidos individuales: Ala 400 mM, Glu 100 mM, Lys 400 mM, Thr 400 mM, Asn 200 mM, Asp 100 mM, His 300 mM, Pro 400 mM, Ser 400 mM, Trp 60 mM, Val 400 mM.

25 Se realizaron la adsorción de LO-MM-3 a la placa y la aplicación del recubrimiento posterior; la esterilización y el envejecimiento acelerado; así como el procedimiento de ELISA general tal como se describió en la sección de materiales y métodos.

Resultado:

30 Tal como puede observarse en las figuras 6 y 7, el efecto protector de una mezcla de aminoácidos no puede atribuirse a un efecto protector de un único aminoácido de la mezcla.

35 La combinación de aminoácidos muestra un efecto protector del 65% (4 aminoácidos) y el 85% (8 aminoácidos), mientras que el efecto promedio de los aminoácidos individuales de esas mezclas es del 22% (4 aminoácidos) y el 33% (8 aminoácidos) de la unión a antígeno como capacidad en comparación con el control sin esterilizar. El efecto máximo de aminoácidos individuales es al 28% (4 aminoácidos) y el 55% (8 aminoácidos).

40 Ejemplo 3: La adición de ácido glicirrónico a la disolución aumenta adicionalmente el efecto protector de recubrimientos posteriores de aminoácidos.

Experimento:

45 Se disolvieron los aminoácidos en o bien NaOH 0,5 M (Merck, 106482) o bien HCl 0,5 M (Merck, 100319) para obtener disoluciones madre con una concentración máxima. Las disoluciones madre de aminoácidos se mezclaron entre sí para conseguir una concentración de aminoácidos total de 200 mM en la disolución de recubrimiento posterior. Se usaron los aminoácidos en razón equimolar (2 aminoácidos: 2 x 100 mM; 3 aminoácidos: 3 x 67 mM; 4 aminoácidos: 4 x 50 mM; etc.).

50 Se disolvió ácido glicirrónico (sal de amonio, Fluka, 50531) en etanol al 50% (absoluto, Sigma-Aldrich, 32205) para obtener una disolución madre 25 mM. Se diluyó el ácido glicirrónico 1:25 para obtener una concentración de 1 mM en las disoluciones de recubrimiento posterior.

55 El pH de las mezclas de aminoácidos se estableció a aproximadamente 7,0; y las mezclas se diluyeron adicionalmente en PBS para conseguir la concentración de aminoácidos final de 200 mM.

Se realizaron la adsorción de LO-MM-3 a la placa y la aplicación del recubrimiento posterior; la esterilización y el envejecimiento acelerado; así como el procedimiento de ELISA general tal como se describió en la sección de materiales y métodos.

60 Resultados:

65 La adición de ácido glicirrónico a diferentes recubrimientos posteriores de aminoácidos mejora el efecto protector de todos los recubrimientos posteriores hasta un valor máximo del 75-80% (capacidad de unión a antígeno en comparación con el control sin irradiar) tal como se muestra en la figura 8. El ácido glicirrónico solo no tiene un efecto protector como recubrimiento posterior.

Ejemplo 4: Recubrimientos posteriores de aminoácidos proporcionan una protección frente a condiciones de estrés al menos comparable a recubrimientos posteriores que contienen sustancias protectoras convencionales como albúmina y manitol.

5 Experimento:

Se preparó el recubrimiento posterior de aminoácidos tal como se describió en el ejemplo 3. Se usó albúmina humana a una concentración de 20 g/l y manitol a 10 g/l, diluidos en PBS.

10 Se realizaron la adsorción de LO-MM-3 a la placa y la aplicación del recubrimiento posterior; la esterilización y el envejecimiento acelerado; así como el procedimiento de ELISA general tal como se describió en la sección de materiales y métodos.

15 Resultados:

Tal como se representa en la figura 9, recubrimientos posteriores de aminoácidos proporcionan un efecto protector comparable a o incluso mejor que recubrimientos posteriores basados en albúmina y manitol, dependiendo de la forma de estrés aplicado.

20 Un recubrimiento posterior de aminoácidos que consiste en cinco aminoácidos diferentes (200 mM) y ácido glicirrónico 1 mM muestra un efecto protector del 80% de la capacidad de unión a antígeno en comparación con el control sin tratar después de la irradiación (25 kGy) y del 85% después del procedimiento de envejecimiento acelerado, respectivamente. El recubrimiento posterior que consiste en albúmina y manitol muestra el 65% de la actividad del control sin tratar después de la irradiación (25 kGy). Después de envejecimiento acelerado durante 7 días a 45°C, casi no queda actividad con albúmina y manitol, similar a los controles sin ningún recubrimiento posterior.

Ejemplo 5: Mezclas de aminoácidos bloquean la unión inespecífica, por ejemplo, a placas de ELISA.

30 Experimento:

Se adsorbió LO-MM-3 a una placa de ELISA tal como se describió en materiales y métodos. Se bloqueó la superficie de la placa incubando los pocillos con 300 µl de disolución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiental. Como bloqueo se usaron o bien albúmina humana 10 g/l en PBS o bien 20 g/l de una mezcla de 18 aminoácidos en PBS. El siguiente procedimiento de ELISA se realizó tal como se describió en la sección de materiales y métodos.

35 Resultados:

40 Las mezclas de aminoácidos también pueden bloquear la unión inespecífica a superficies, tal como se muestra en la figura 10. Una mezcla de 18 aminoácidos bloquea la unión inespecífica a una placa de ELISA sin inhibir interacciones antígeno-anticuerpo específicas. La eficiencia de bloqueo es comparable a bloqueos con albúmina convencionales.

Ejemplo 6: Mezclas de aminoácidos proporcionan protección frente al estrés para enzimas como ADNasa.

45 Experimento:

Adsorción de ADNasa a una placa de ELISA y aplicación de recubrimientos posteriores

50 La enzima ADNasa (Sigma Aldrich, DN25) se adsorbió a la superficie de una placa de ELISA de 96 pocillos (Greiner Bio-one, 655061). Se diluyó la ADNasa en PBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺, PAA, H15-002) hasta una concentración de 1 mg/ml. Se pipetearon 100 µl de la disolución de enzima a cada pocillo y se incubó durante la noche a 5°C. Se lavó la placa 2 veces con PBS⁻.

55 Cuatro pocillos se trataron idénticamente para calcular las medias y desviaciones estándar en el siguiente análisis. La unión inespecífica a la placa se bloqueó con 200 µl de disolución de bloqueo por pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiental. Se lavó la placa 2 veces con PBS⁻. Se pipetearon 200 µl de cada recubrimiento posterior por pocillo. Se incubó la placa con las disoluciones de recubrimiento posterior durante 1 hora a temperatura ambiental. Se desecharon los recubrimientos posteriores y se secó la placa a temperatura ambiental.

60 Disoluciones de bloqueo y recubrimiento posterior:

- BLOQUEO:

65 Albúmina humana 20 g/l (Biotest Pharma) en PBS⁻

- RECUBRIMIENTO POSTERIOR:

Albúmina humana 20 g/l + manitol 10 g/l (Serag Wiesner, 219675) en PBS^{-/-}

5 - BLOQUEO:

Aminoácidos 20 g/l (Ala, Asp, Arg, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val) en PBS^{-/-}

- RECUBRIMIENTO POSTERIOR:

10 Aminoácidos 20 g/l (Ala, Asp, Arg, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val) + ácido glicirrónico 0,25 mM (sal de amonio, Fluka, 50531) en PBS^{-/-}

Exposición a estrés de la superficie recubierta

15 Se esterilizó una placa mediante irradiación (beta, 25 kGy). La irradiación se realizó en Beta-Gamma Service, Bruchsal, Alemania.

20 Una placa idéntica sin exposición a estrés sirvió como control. El efecto protector se calculó como la funcionalidad de ADNasa restante después de condiciones de estrés en comparación con el control sin tratar.

$$\text{funcionalidad (\%)} = \frac{\text{placa con estrés} \cdot 100}{\text{placa de control}}$$

Detección de la funcionalidad ADNasa

30 Se lavó la placa 3 veces con PBS^{-/-}. Se diluyó patrón de ADNbc (Sigma Aldrich, D1501) hasta 1 µg/ml en PBS (con Ca²⁺/Mg²⁺, Hyclone, SH3026401). A cada pocillo se le añadieron 50 µl de la disolución de ADN y se incubó durante 1 hora a 37°C. Se diluyó el colorante de ADN fluorescente Picogreen (Molecular Probes, P7581) 1:1000 (PBS) y se añadieron 150 µl del colorante a la disolución de ADN en cada pocillo.

35 Se midió la fluorescencia de Picogreen, el filtro de excitación se estableció a 485 nm y la emisión se detectó a 530 nm (Fusion Photometer A153601, PerkinElmer). La señal de fluorescencia se correlaciona con la concentración de ADN. Se determinó la actividad ADNasa como la reducción de ADN, es decir señal de fluorescencia.

Resultados:

40 Tal como se representa en la figura 11, recubrimientos posteriores de aminoácidos proporcionan un efecto protector frente al estrés (irradiación) también para enzimas como ADNasa. La protección es comparable a la de recubrimientos posteriores basados albúmina y manitol.

45 Un recubrimiento posterior de aminoácidos que consiste en 18 aminoácidos diferentes (20 g/l) y ácido glicirrónico 0,25 mM muestra un efecto protector del 83% de la actividad ADNasa en comparación con el control sin tratar después de la irradiación (25 kGy). El recubrimiento posterior que consiste en albúmina y manitol muestra el 95% de la actividad del control sin tratar después de la irradiación (25 kGy).

50 Ejemplo 7: Recubrimientos posteriores de aminoácidos proporcionan una protección frente a condiciones de estrés para anticuerpos terapéuticos como IgG infliximab

Experimento:

55 El anticuerpo terapéutico infliximab (IgG humanizada, anti-TNF-α humano, Centocor, DD7701504) se adsorbió a la superficie de la placa de ELISA. Se diluyó infliximab con PBS^{-/-} hasta una concentración de 1 µg/ml y se pipetearon 100 µl de la disolución a cada pocillo. Se incubó la placa durante la noche a 5°C y se lavó 2 x con tampón de lavado.

60 Se realizaron la aplicación del recubrimiento posterior; la esterilización y el envejecimiento acelerado tal como se describió en la sección de materiales y métodos.

Detección por ELISA de la funcionalidad de infliximab

65 Los recubrimientos posteriores secados se retiraron de los pocillos lavando la placa 3 veces. La placa de ELISA se bloqueó pipeteando 300 µl de disolución de bloqueo (albúmina 10 g/l en PBS) a cada pocillo e incubando durante 1

hora a temperatura ambiental. Se lavó la placa 3 veces.

El antígeno para infliximab, TNF- α (recombinante humano, R&D, cat. 210-TA), se diluyó hasta 1 ng/ml y se pipetearon 200 μ l de la disolución de antígeno a cada pocillo. Se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiental y se lavó 3 veces.

Se detectó el antígeno unido mediante un anticuerpo de detección (anti- TNF- α humano marcado con HRP, R&D, cat. DTA00C). La disolución lista para usar del anticuerpo de detección se diluyó 1:2 con PBS. A cada pocillo se le añadieron 200 μ l y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiental. Se lavó la placa 3 veces.

Se pipetearon 200 μ l de una disolución de sustrato de ELISA lista para usar para HRP (TMB = tetrametilbencidina) a cada pocillo. Se incubó la placa durante 20 minutos a temperatura ambiental y se protegió de la luz. Para detener la reacción de color, a cada pocillo se le añadieron 50 μ l de H₂SO₄ (diluido 1:5 con agua dest.). Se detectó el color amarillo resultante midiendo la absorción a una longitud de onda de 450 nm.

Resultados:

Tal como se representa en la figura 12, recubrimientos posteriores de aminoácidos con o sin ácido glicirrónico proporcionan un efecto protector comparable a o incluso mejor que recubrimientos posteriores basados en albúmina y manitol, dependiendo de la forma de estrés aplicado.

Un recubrimiento posterior de aminoácidos que consiste en 18 aminoácidos diferentes (20 g/l en PBS) muestra un efecto protector del 85% de la capacidad de unión a antígeno en comparación con el control sin tratar después de la irradiación (25 kGy) y del 90% después del procedimiento de envejecimiento acelerado, respectivamente. Con la adición de ácido glicirrónico 1 mM al recubrimiento posterior de aminoácidos el efecto protector es del 92% de la capacidad de unión a antígeno en comparación con el control sin tratar después de la irradiación (25 kGy) y del 95% después del procedimiento de envejecimiento acelerado, respectivamente. El recubrimiento posterior que consiste en albúmina y manitol muestra el 72% de la actividad del control sin tratar después de la irradiación (25 kGy). Después de envejecimiento acelerado durante 6 días a 45°C, queda sólo el 15% de actividad con albúmina y manitol, similar a los controles sin ningún recubrimiento posterior.

Ejemplo 8: Recubrimientos posteriores de aminoácidos proporcionan una protección frente a condiciones de estrés para ácidos nucleicos (ADNbc)

Experimento:

Se adsorbió ADNbc (Sigma, D1501) a la superficie de la placa de ELISA. Se disolvió el ADN en PBS^{-/-} (1 mg/ml) con EDTA 1 mM (Fluka, 50531) para inhibir la posible actividad ADNasa. Se diluyó el ADN con PBS 1:64 hasta 15 μ g/ml y se pipetearon 100 μ l de la disolución a cada pocillo. Se incubó la placa durante la noche a 5°C y se lavó 2 x con PBS^{-/-}.

Se realizaron la aplicación del recubrimiento posterior y la esterilización tal como se describió en la sección de materiales y métodos.

Detección de ADNbc intacto con Picogreen

Los recubrimientos posteriores secados se retiraron de los pocillos lavando la placa 3 veces. A cada pocillo se le añadieron 100 μ l de colorante Picogreen (diluido 1:1000 en PBS^{-/-}, Molecular Probes, P7581). Se midió inmediatamente la fluorescencia de Picogreen, el filtro de excitación se estableció a 485 nm y se detectó la emisión a 530 nm (Fusion Photometer A153601, PerkinElmer). La señal de fluorescencia se correlaciona con la concentración de ADNbc intacto.

Resultados:

Tal como se representa en la figura 13, recubrimientos posteriores de aminoácidos pueden proporcionar un efecto protector del 55-60%, independientemente de la adición de ácido glicirrónico o manitol. Sin recubrimiento posterior, la cantidad de ADNbc intacto se reduce hasta el 20% cuando se irradia con 25 kGy. Sustancias estabilizantes convencionales como albúmina y manitol proporcionan una protección de aproximadamente el 85%.

Ejemplo 9: Efecto protector de una composición de aminoácidos específica

Se disolvieron en agua 20 mg de anticuerpo humano anti-hepatitis A (beriglobina (IgG humana, AK), CSL Behring) y 40 mg de una composición protectora hasta un volumen total de 525 μ l por muestra y se liofilizó. Después de eso, se disolvieron las muestras en 1 ml agua y se sometieron a prueba para determinar la funcionalidad usando un ELISA de IgG frente a VHA (virus de la hepatitis A).

Composición:

- 5 20 g de arginina
20 g de histidina
20 g de lisina
10 3 g de ácido glutámico
2 g de triptófano
15 20 g de glicina
15 g de alanina
0,2 g de Tween 80
20 1 g sal de amonio de ácido glicirrónico
- Se ajustó el pH a aproximadamente 7,2 usando NaOH y/o NaCl. Después de eso, se sometieron las disoluciones a filtración estéril.
- 25 Se mezclaron 400 µl de disolución (correspondiente a 40 mg de compuestos sólidos) con 125 µl de beriglobina (correspondiente a 20 mg de anticuerpo)

Liofilización:

- 30 Se llevó a cabo la liofilización tal como sigue:
temperatura de congelación inicial -40°C;
inicio de vacío de 0,1 mBar tras un tiempo de congelación de 3 h;
35 aumento de temperatura de aproximadamente 1,5°C/h durante 23 h;
6 h de secado durante la noche a 6°C y 0,004 mBar.

Esterilización:

- 40 Las muestras liofilizadas se irradiaron con 25 kGy y una con 50 kGy de radiación beta.

Resultados:

- 45 Los resultados del ELISA de VHA se representan en la figura 14.
- Tras el secado y la esterilización, se obtuvieron tortas blancas, inodoras, inherentemente estables. Se añadió 1 ml de agua a cada muestra y se monitorizó el comportamiento de la disolución. La disolución tuvo lugar en el plazo de
50 menos de 30 segundos y estaba libre de agregados. Incluso tras 24 h no era detectable ni agregación macroscópica ni microscópica.

Conclusión:

- 55 La aplicación de la composición dio como resultado sólo una pequeña pérdida de la porción de anticuerpo frente a hepatitis A de beriglobina en comparación con el control sin irradiar.

Ejemplo 10: Prueba de diferentes saponinas como compuestos estabilizantes. La clase estructural de saponinas tiene un efecto estabilizante sobre los anticuerpos

60 Materiales y métodos

- Todos los experimentos se basaron en el mismo diseño de ensayo ELISA básico (véase anteriormente).
- 65 Adsorción de LO-MM-3 a una placa de ELISA y aplicación de recubrimientos posteriores

Exposición a estrés de la superficie recubierta

Detección por ELISA de la funcionalidad de LO-MM-3

5 Experimento:

Se realizaron la adsorción de LO-MM-3 a la placa y la aplicación del recubrimiento posterior y la esterilización; así como el procedimiento de ELISA general tal como se describió en la sección de materiales y métodos. La dosis de irradiación (haz de electrones) era de 50 kGy.

10

Resultados:

Los resultados del experimento se representan en la figura 15. La clase estructural de saponinas tiene el potencial de mejorar el efecto protector de combinaciones de aminoácidos. Se prefiere el uso de la saponina ácido glicirrónico.

15

Ejemplo 11: Composiciones estabilizantes que comprenden al menos 3 aminoácidos diferentes o al menos dos aminoácidos diferentes y una saponina tal como ácido glicirrónico proporcionan una protección muy buena

Materiales y métodos

20

Todos los experimentos se basaron en el mismo diseño de ensayo ELISA básico (véase anteriormente).

Adsorción de LO-MM-3 a una placa de ELISA y aplicación de recubrimientos posteriores

25

Exposición a estrés de la superficie recubierta

Detección por ELISA de la funcionalidad de LO-MM-3

Experimento:

30

Se disolvieron los aminoácidos en o bien NaOH 0,5 M (Merck, 106482) o HCl 0,5 M (Merck, 100319) para obtener disoluciones madre con una concentración máxima. Las disoluciones madre de aminoácidos se mezclaron entre sí en diferentes combinaciones para conseguir concentraciones de aminoácidos totales de 20 g/l en las disoluciones de recubrimiento posterior.

35

El pH de las mezclas de aminoácidos se estableció a aproximadamente 7,0.

Se realizaron la adsorción de LO-MM-3 a la placa y la aplicación del recubrimiento posterior y la esterilización; así como el procedimiento de ELISA general tal como se describió en la sección de materiales y métodos. La dosis de irradiación (haz de electrones) era de 50 kGy.

40

Resultados:

Los resultados del experimento se representan en la figura 16. Combinaciones de al menos 3 aminoácidos y combinaciones de 2 aminoácidos con la adición de ácido glicirrónico proporcionan una protección máxima (más del 75%) de un anticuerpo inmovilizado cuando se esteriliza con 50 kGy de irradiación beta.

45

Ejemplo 12: Una composición de aminoácidos preferida proporciona protección en diferentes condiciones de estrés

50 Materiales y métodos

Todos los experimentos se basaron en el mismo diseño de ensayo ELISA básico (véase anteriormente).

Adsorción de LO-MM-3 a una placa de ELISA y aplicación de recubrimientos posteriores

55

Exposición a estrés de la superficie recubierta

Detección por ELISA de la funcionalidad de LO-MM-3

60 Experimento:

Composiciones usadas:

Composición protectora A (compuesto por litro)

65

20 g de arginina

20 g de histidina

20 g de lisina

3 g de glutamina

2 g de triptófano

20 g de glicina

15 g de alanina

0,2 g de Tween 80

1 g de sal de amonio de ácido glicirrónico

Se ajustó el pH a aproximadamente 7,2 usando NaOH y/o HCl. Después de eso, se sometieron las disoluciones a filtración estéril.

Se realizaron la adsorción de LO-MM-3 a la placa y la aplicación del recubrimiento posterior y la esterilización; así como el procedimiento de ELISA general tal como se describió en la sección de materiales y métodos.

Resultados: Los resultados del experimento se representan en la figura 17. La composición de aminoácidos proporciona protección en diferentes condiciones de estrés. La mejor protección se proporciona para irradiación beta con diferentes dosis y envejecimiento artificial a temperatura elevada. La protección para irradiación gamma o esterilización con óxido de etileno es menor pero todavía relevante.

Ejemplo 13: Recubrimientos posteriores de aminoácidos proporcionan protección durante almacenamiento prolongado

Experimento:

Se disolvieron los aminoácidos en o bien NaOH 0,5 M (Merck, 106482) o bien HCl 0,5 M (Merck, 100319) para obtener disoluciones madre con una concentración máxima. Las disoluciones madre de aminoácidos se mezclaron entre sí para conseguir una concentración de aminoácidos total de 200 mM en la disolución de recubrimiento posterior. Se usaron los aminoácidos en razón equimolar.

18 aminoácidos: Ala, Arg, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val

5 aminoácidos (1): Asp, Arg, Phe, Ser, Val

5 aminoácidos (2): Ala, Glu, Lys, Thr, Trp

2 aminoácidos (1): Asp, Val

2 aminoácidos (2): Ala, Glu

El pH de las mezclas de aminoácidos se estableció a aproximadamente 7,0; y las mezclas se diluyeron adicionalmente en PBS para conseguir la concentración final de 200 mM.

Se realizaron la adsorción de LO-MM-3 a la placa y la aplicación del recubrimiento posterior y la esterilización; así como el procedimiento de ELISA general tal como se describió en la sección de materiales y métodos. Se simuló el almacenamiento prolongado mediante un procedimiento de envejecimiento acelerado. Se almacenaron las placas a 45°C y se determinó la actividad del anticuerpo después de 0, 10, 25, 41 y 62 días de almacenamiento. Esto es igual al envejecimiento en tiempo real a 5°C de 0, 6, 12, 24 y 36 meses.

Resultados:

Recubrimientos posteriores de aminoácidos que contienen al menos 5 aminoácidos proporcionan protección durante el almacenamiento prolongado. Para las muestras no esterilizadas, después de 62 días a 45°C se conserva aproximadamente el 80% de la capacidad de unión a antígeno. Las muestras esterilizadas (beta, 25 kGy) mantienen aproximadamente el 70% de su capacidad de unión a antígeno después de 62 días a 45°C. Recubrimientos posteriores de aminoácidos que contienen solo 2 aminoácidos mantienen solo aproximadamente el 40% la capacidad de unión a antígeno durante el proceso de almacenamiento, independientemente de la esterilización. La adición de ácido glicirrónico 1 mM a las disoluciones de recubrimiento posterior refuerza el efecto protector: para las

muestras no esterilizadas que contienen al menos 5 aminoácidos y ácido glicirrónico, después de 62 días a 45°C se conserva aproximadamente el 90% de la capacidad de unión a antígeno. Las muestras esterilizadas (beta, 25 kGy) mantienen aproximadamente el 80% de su capacidad de unión a antígeno después de 62 días a 45°C. Recubrimientos posteriores de aminoácidos que contienen 2 aminoácidos y ácido glicirrónico mantienen aproximadamente el 70% de la capacidad de unión a antígeno durante el proceso de almacenamiento.

Ejemplo 14: Recubrimientos posteriores de aminoácidos proporcionan protección durante diferentes procesos de esterilización

Experimento:

Se disolvieron los aminoácidos en o bien NaOH 0,5 M (Merck, 106482) o bien HCl 0,5 M (Merck, 100319) para obtener disoluciones madre con una concentración máxima. Las disoluciones madre de aminoácidos se mezclaron entre sí para conseguir una concentración de aminoácidos total de 200 mM en la disolución de recubrimiento posterior. Se usaron los aminoácidos en razón equimolar.

18 aminoácidos: Ala, Arg, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val

5 aminoácidos: Asp, Arg, Phe, Ser, Val

2 aminoácidos: Asp, Val

El pH de las mezclas de aminoácidos se estableció a aproximadamente 7,0; y las mezclas se diluyeron adicionalmente en PBS para conseguir la concentración final de 200 mM.

Se realizaron la adsorción de LO-MM-3 a la placa y la aplicación del recubrimiento posterior y la esterilización; así como el procedimiento de ELISA general tal como se describió en la sección de materiales y métodos. Se irradió una placa (gamma, 25 kGy). La irradiación se realizó en Beta-Gamma-Service, Bruchsal, Alemania. Se esterilizó otra placa mediante EO (ciclo de ETO BO1); la esterilización se realizó en Rose GmbH, Trier, Alemania.

Resultados:

Muestras esterilizadas con irradiación gamma mantienen aproximadamente el 85% de la actividad cuando se protegen con un recubrimiento posterior de aminoácidos que contiene 18 aminoácidos; este efecto no se mejora adicionalmente con ácido glicirrónico; con 5 aminoácidos la actividad restante es del 75%; con 2 aminoácidos solo se mantiene el 40%. La protección con 2 aminoácidos se mejora mediante la adición de ácido glicirrónico; en este caso la actividad restante es del 65%. Muestras esterilizadas con ETO mantienen aproximadamente el 85% de la actividad cuando se protegen con un recubrimiento posterior de aminoácidos que contiene 18 aminoácidos; este efecto no se mejora adicionalmente con ácido glicirrónico. Recubrimientos posteriores que contienen 5 o 2 aminoácidos tienen solo poco efecto protector; la adición de ácido glicirrónico menora la protección marginalmente.

Ejemplo 15: Recubrimientos posteriores que consisten en aminoácidos y dipéptidos proporcionan protección frente a altas dosis de irradiación

Materiales y métodos

- Todos los experimentos se basaron en el mismo diseño de ensayo ELISA básico (véase anteriormente)
- Adsorción de LO-MM-3 a una placa de ELISA y aplicación de recubrimientos posteriores
- Exposición a estrés de la superficie recubierta
- Detección por ELISA de la funcionalidad de LO-MM-3

Experimento:

Se disolvieron los aminoácidos en o bien NaOH 0,5 M (Merck, 106482) o bien HCl 0,5 M (Merck, 100319) para obtener disoluciones madre con una concentración máxima. Las disoluciones madre de aminoácidos se mezclaron entre sí para conseguir una concentración de aminoácidos total de 20 g/l en la disolución de recubrimiento posterior. Los dipéptidos solos se usaron con una concentración de 10 g/l y en combinación con aminoácidos con 2 g/l.

7 aminoácidos: Arg, His, Lys, Glu, Trp, Gly, Ala

2 dipéptidos: Gly-Tyr, Gly-Gln

El pH de las mezclas de aminoácidos se estableció a aproximadamente 7,0.

Se realizaron la adsorción de LO-MM-3 a la placa y la aplicación del recubrimiento posterior y la esterilización; así como el procedimiento de ELISA general tal como se describió en la sección de materiales y métodos. La dosis de irradiación (haz de electrones) era de 50 kGy.

Resultados:

Muestras esterilizadas con 50 kGy de irradiación beta mantienen aproximadamente el 60% de la actividad cuando se protegen con un recubrimiento posterior de aminoácidos que contiene solo 7 aminoácidos; este efecto se mejora adicionalmente con la adición de dipéptidos tales como Gly-Tyr o combinaciones de dipéptidos. El ácido glicirrónico no mejora el efecto protector de la combinación de dipéptidos de aminoácidos adicionalmente.

Ejemplo 16: Se esterilizó interleucina-8 en viales de vidrio, el propio vial es el portador.

Experimento:

Se diluyó interleucina-8 (IL-8, R&D, 208-IL) en PBS (sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, PAA, H15-002) hasta 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se añadieron 5 μl de la disolución (50 ng de IL-8) a viales de vidrio y se hicieron rotas durante 4 horas hasta que se secaron. Se añadieron 25 μl de una disolución estabilizante (mezcla de aminoácidos 20 g/l y ácido glicirrónico 1 mM (sal de amonio, Fluka, 50531)) y se rotaron/secaron durante la noche.

Se esterilizaron los viales con ≥ 25 kGy (irradiación beta). Se almacenaron controles sin esterilizar en condiciones frías.

Ensayo:

Se aislaron granulocitos neutrófilos a partir de sangre completa con ACDA al 10%. Se sedimentaron 20 ml de sangre con ACDA (10%) con 2 ml de HES (Grifols 662650). Se pipeteó el sobrenadante a 7 ml de Percoll (L6143) y se centrifugó 20 min a 2000 x g. Se resuspendieron los granulocitos aislados en suero autólogo al 1% y se establecieron a un recuento celular de $0,5 \times 10^6/\text{ml}$.

Como controles positivos, se disolvieron 5 μl de disolución de IL-8 (50 ng) en 25 μl de la disolución estabilizante (A y B). A cada vial estéril se le añadió 1 ml de PBS (con $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, Hyclone, SH3026401) (con suero autólogo al 1%) para disolver la película secada.

Para detectar la actividad quimiotáctica de las muestras, las disoluciones de IL-8 completas de los viales estéril y no estéril y los controles se pipetearon a placas de 12 pocillos. Se insertaron filtros de migración (3 μm , Corning, 3462) y se pipetearon 500 μl de la suspensión de granulocitos a los filtros. Se incubaron las placas durante 30 min a 37°C. Se detectó el número de células migradas contando las células en cada pocillo por medio de FACS y recuento de perlas (Invitrogen, C36950).

Resultados:

Véase la figura 26

La biomolécula (en este caso interleucina 8 = IL8) pierde la mayor parte de su función biológica durante la esterilización posterior (≥ 25 kGy de irradiación) si no se añade estabilizador. En cambio, con aminoácidos diferentes se protegió la biomolécula. Se muestra la actividad quimiotáctica de IL8 sobre granulocitos neutrófilos humanos.

Ejemplo 17: Se esterilizó interleucina-8 en viales de vidrio, el propio estabilizador es el portador.

Experimento:

Se diluyó interleucina-8 (IL-8) en PBS (sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, PAA, H15-002) hasta 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se mezclaron 5 μl de la disolución (50 ng de IL-8) y 25 μl de una disolución estabilizante (mezcla de aminoácidos 20 g/l y ácido glicirrónico 1 mM (sal de amonio, Fluka, 50531)) y se pipetearon a viales de vidrio. Los viales se rotaron/secaron durante la noche.

Se esterilizaron los viales mediante irradiación con ≥ 25 kGy. Se almacenaron controles sin esterilizar en condiciones frías.

Ensayo:

Se aislaron granulocitos neutrófilos a partir de sangre completa con ACDA al 10%. Se sedimentaron 20 ml de sangre con ACDA (10%) con 2 ml de HES (Grifols 662650). Se pipeteó el sobrenadante a 7 ml de Percoll (L6143) y se

centrifugó 20 min a 2000 x g. Se resuspendieron los granulocitos aislados en suero autólogo al 1% y se establecieron a un recuento celular de $0,5 \times 10^6/\text{ml}$.

5 Como controles positivos, se disolvieron 5 μl de disolución de IL-8 (50 ng) en 25 μl de una disolución estabilizante (A y B). A cada vial estéril se le añadió 1 ml de PBS (con $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, Hyclone, SH3026401) (con suero autólogo al 1%) para disolver la película secada.

10 Para detectar la actividad quimiotáctica de las muestras, las disoluciones de IL-8 completas de los viales estéril y no estéril y los controles se pipetearon a placas de 12 pocillos. Se insertaron filtros de migración (3 μm) y se pipetearon 500 μl de la suspensión de granulocitos a los filtros. Se incubaron las placas durante 30 min a 37°C. Se detectó el número de células migradas contando las células en cada pocillo (por medio de FACS y recuento de perlas).

Resultados:

15 Véase la figura 29

20 La biomolécula (en este caso interleucina 8 = IL8) pierde la mayor parte de su función biológica durante la esterilización posterior (≥ 25 kGy de irradiación) si no se añade estabilizador. En cambio, una disolución de estabilizador con aminoácidos diferentes protegió la biomolécula. Se muestra la actividad quimiotáctica de IL8 sobre granulocitos neutrófilos humanos.

Ejemplo 18: Se esterilizó anticuerpo anti-IgG de ratón en viales de vidrio, el propio estabilizador es el portador.

Experimento:

25 Se diluyó anticuerpo anti-IgG de ratón (biotinilado, Jackson ImmunoResearch, 115-065-003) en PBS (sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, PAA, H15-002) hasta 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se mezclaron 25 μl (100 ng) de la disolución de anticuerpos y 25 μl de una disolución estabilizante concentrada 2 x (mezcla de aminoácidos 20 g/l y ácido glicirrónico 1 mM (sal de amonio, Fluka, 50531)) y se pipetearon a viales de vidrio. Los viales se rotaron/secaron durante la noche.

30 Se esterilizaron los viales mediante irradiación con ≥ 25 kGy. Se almacenaron controles sin esterilizar en condiciones frías.

Ensayo:

35 Se recubrió una placa de ELISA (Greiner Bio-one, 655061) con el antígeno (IgG de ratón, Innovativ Research, Ir-Ms-Gf): se diluyó el antígeno hasta 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se pipetearon 100 μl a cada pocillo y se incubaron durante la noche a 4°C. Se lavó la placa dos veces con tampón de lavado (concentrado 25x, Invitrogen, WB02). Se bloqueó la placa con albúmina (5%) y se lavó de nuevo 3 veces.

40 A todos los viales de muestra se les añadieron 200 μl de PBS para disolver la película secada (teóricamente 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las muestras se diluyeron hasta 10 ng/ml con PBS. Para calcular la concentración de anticuerpo, se preparó una dilución en serie de anticuerpo nuevo.

45 Las muestras y el patrón se pipetearon a la placa de ELISA (2 x 200 μl cada una) y se incubaron 1 h a temperatura ambiental. Se lavó la placa 3 x. A cada pocillo se le añadieron 200 μl de disolución de estreptavidina (marcada con peroxidasa del rábano (HRP), Pierce, 21126, diluida hasta 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS) y se incubaron 1 h a temperatura ambiental. Se lavó la placa 3 x. Se diluyó sustrato cromogénico de HRP TMB (TMB = tetrametilbencidina, Invitrogen, 00-2023) 1:2 en H₂O y se añadieron 200 μl a cada pocillo. Se incubó la placa 15 min a temperatura ambiental y se protegió de la luz. Para detener la reacción de color, se añadieron 50 μl de H₂SO₄ diluido (diluido 1:5 con agua dest., Merck, 1007311000). Se detectó la absorción de la placa a 450 nm (Fusion Photometer A153601, PerkinElmer).

Resultados:

55 Véase la figura 30

60 La biomolécula (en este caso un anticuerpo anti-IgG de ratón) pierde la mayor parte de su función biológica durante el almacenamiento posterior y o esterilización (≥ 25 kGy de irradiación) si no se añade estabilizador. En cambio, una disolución de estabilizador con aminoácidos diferentes protegió la biomolécula. Se muestra la unión específica al antígeno.

Ejemplo 19: Se esterilizó anticuerpo anti-IgG de ratón, el portador es una espuma de poliuretano.

65 Experimento:

A partir de una espuma de poliuretano (PU) porosa fina (Smith&Nephew, 66012608), se troquelaron muestras con un diámetro definido (1 cm). Se unió anticuerpo anti-IgG de ratón (biotinilado, Jackson ImmunoResearch, 115-065-003) a las muestras: el anticuerpo se diluyó hasta 5 µg/ml o bien en PBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺, PAA, H15-002) o bien en una disolución estabilizante (mezcla de aminoácidos 20 g/l y ácido glicirrónico 1 mM (sal de amonio, Fluka, 50531)) y las muestras de PU se cubrieron con disoluciones de anticuerpos. Se incubaron las muestras 1 h a 37°C.

La disolución de anticuerpos se retiró y las muestras de PU se secaron al aire durante 2 h. Se esterilizaron las muestras por medio de irradiación beta (25 kGy) y se almacenaron controles no estériles en condiciones frías.

Ensayo:

Se recubrió una placa de ELISA (Greiner Bio-one, 655061) con el antígeno (IgG de ratón, Innovativ Research, Ir-Ms-Gf): se diluyó el antígeno hasta 1 µg/ml, se pipetearon 100 µl a cada pocillo y se incubaron durante la noche a 4°C. Se lavó la placa 2 x con tampón de lavado (concentrado 25x, Invitrogen, WB02). Se bloqueó la placa con albúmina (5%) y se lavó de nuevo 3 x.

Se cubrieron las muestras de PU con PBS y se incubaron 1 h a temperatura ambiental. Las disoluciones de muestra se recogieron y diluyeron 1:20 y además se diluyeron en serie 1:4 con PBS. Para calcular la concentración de anticuerpo de las muestras, se preparó una dilución en serie de anticuerpo nuevo.

Las muestras y el patrón se pipetearon a la placa de ELISA (2 x 200 µl cada una) y se incubaron 1 h a temperatura ambiental. Se lavó la placa 3 x. A cada pocillo se le añadieron 200 µl de disolución de estreptavidina (marcada con peroxidasa del rábano (HRP), Pierce, 21126, diluida hasta 0,1 µg/ml en PBS) y se incubaron 1 h a temperatura ambiental. Se lavó la placa 3 x. Se diluyó sustrato cromogénico de HRP TMB (TMB = tetrametilbencidina, Invitrogen, 00-2023) 1:2 en H₂O y se añadieron 200 µl a cada pocillo. Se incubó la placa 15 min a temperatura ambiental y se protegió de la luz. Para detener la reacción de color, se añadieron 50 µl de H₂SO₄ diluido (diluido 1:5 con agua dest., Merck, 1007311000). Se detectó la absorción de la placa a 450 nm (Fusion Photometer A153601, PerkinElmer).

Resultados:

La biomolécula (en este caso un anticuerpo anti-IgG de ratón) pierde la mayor parte de su función biológica durante el almacenamiento posterior y o la esterilización (25 kGy de irradiación) si no se añade estabilizador. En cambio, una disolución de estabilizador protegió la biomolécula. La recuperación del anticuerpo es casi del 100% (5 µg/ml). Se muestra la unión específica al antígeno.

Ejemplo 20: Se esterilizó anticuerpo anti-IgG de ratón, el portador es un hidrogel de PVA.

Experimento:

Se preparó una disolución al 7% (m/v) de poli(alcohol vinílico) (PVA, Sigma, 341584-25G) en agua (calentada hasta 85°C). Se enfrió la disolución hasta temperatura ambiental. Se diluyó anticuerpo anti-IgG de ratón (biotinilado, Jackson ImmunoResearch, 115-065-003) hasta 200 µg/ml en PBS.

La mezcla de hidrogel se compuso tal como sigue:

- 6,75 ml de disolución de PVA (7%)

- 4,5 µl de anticuerpo anti-IgG de ratón (200 µg/ml)

- 2,25 o bien PBS o bien disolución estabilizante ((mezcla de aminoácidos 20 g/l y ácido glicirrónico 1 mM (sal de amonio, Fluka, 50531)) en PBS)

Se vertieron hidrogeles de PVA en placas de Petri pequeñas (diámetro 35 mm, 2 ml de disolución). Las películas de hidrogel se secaron al aire durante 48 h. Se esterilizaron las muestras por medio de irradiación beta (25 kGy) y se almacenaron controles no estériles en condiciones frías.

Ensayo:

Se recubrió una placa de ELISA (Greiner Bio-one, 655061) con el antígeno (IgG de ratón, Innovativ Research, Ir-Ms-Gf): se diluyó el antígeno hasta 1 µg/ml, se pipetearon 100 µl a cada pocillo y se incubaron durante la noche a 4°C. Se lavó la placa 2 x con tampón de lavado (concentrado 25x, Invitrogen, WB02). Se bloqueó la placa con albúmina (5%) y se lavó de nuevo 3 x.

ES 2 757 961 T3

Los hidrogeles de PVA se colocaron en placas de 6 pocillos y se cubrieron con 2 ml de PBS (sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, PAA, H15-002). Tras 30 min, 1 h y 2 h se recogió el PBS y se reemplazó con PBS nuevo.

5 Se pipetearon diluciones en serie de las muestras y el patrón a la placa de ELISA (2 x 200 μl cada una) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiental. Se lavó la placa 3 x. A cada pocillo se le añadieron 200 μl de disolución de estreptavidina (marcada con peroxidasa del rábano (HRP), Pierce, 21126, diluida hasta 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS) y se incubaron 1 h a temperatura ambiental. Se lavó la placa 3 x. Se diluyó el sustrato cromogénico TMB (TMB = tetrametilbencidina, Invitrogen, 00-2023) 1:2 en H_2O y se añadieron 200 μl a cada pocillo. Se incubó la placa 15 min a temperatura ambiental y se protegió de la luz. Para detener la reacción de color, se añadieron 50 μl de H_2SO_4 diluido (diluido 1:5 con agua dest., Merck, 1007311000). Se detectó la absorción de la placa a 450 nm (Fusion Photometer A153601, PerkinElmer).

Resultados:

15 La biomolécula (en este caso un anticuerpo anti-IgG de ratón) pierde la mayor parte de su función biológica durante el almacenamiento posterior y o la esterilización (25 kGy de irradiación) si no se añade estabilizador. En cambio, una disolución de estabilizador protegió la biomolécula. La recuperación del anticuerpo eluido es muy alta. Se muestra la unión específica al antígeno.

20 También se describen en el presente documento los siguientes puntos.

1. Uso de una composición que comprende

25 (a) al menos tres aminoácidos diferentes,

(b) al menos dos aminoácidos diferentes y una saponina o

(c) al menos un dipéptido o tripéptido

30 para estabilizar biomoléculas inmovilizadas sobre un portador sólido.

2. Uso del punto 1, en el que las biomoléculas se unen reversiblemente sobre dicho portador sólido.

35 3. Uso del punto 1 o 2, en el que estabilizar las biomoléculas incluye estabilizar la estructura y/o actividad de las biomoléculas, mejorar la vida útil de almacenamiento de biomoléculas y/o proteger las biomoléculas frente al daño mediado por estrés.

40 4. Uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que la composición comprende al menos 4 o al menos 5 aminoácidos diferentes.

5. Uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en el que la composición comprende al menos un aminoácido de cada grupo de,

45 (a) un aminoácido con grupos R no polares, alifáticos;

(b) un aminoácido con grupos R polares, no cargados;

(c) un aminoácido con grupos R cargados positivamente;

50 (d) un aminoácido con grupos R cargados negativamente; y

(e) un aminoácido con grupos R aromáticos.

55 6. Uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en el que los aminoácidos comprendidos en la composición se seleccionan de

(a) alanina, glutamato, lisina, treonina y triptófano;

60 (b) aspartato, arginina, fenilalanina, serina y valina;

(c) prolina, serina, asparagina, aspartato, treonina, fenilalanina;

(d) tirosina, isoleucina, leucina, treonina, valina; y

65 (e) arginina, glicina, histidina, alanina, glutamato, lisina, triptófano.

7. Uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en el que la composición comprende menos del 1% en peso seco de cisteína dentro de la mezcla de al menos dos o al menos tres aminoácidos.
- 5 8. Uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 7, en el que la composición comprende además menos del 1%, más preferiblemente menos del 0,3% de Tween, preferiblemente Tween 80.
9. Uso según uno cualquiera de los puntos 1 a 8, en el que la saponina es ácido glicirrónico o un derivado del mismo.
- 10 10. Un método para producir biomoléculas estabilizadas, que comprende
- (a) unir las biomoléculas a un portador sólido y
- 15 (b) incrustar las biomoléculas en la composición caracterizadas en uno cualquiera de los puntos 1 a 9, de modo que las biomoléculas incrustadas se cubren parcial o completamente mediante la composición caracterizada en uno cualquiera de los puntos 1 a 9.
11. Un método de producción de un portador sólido que tiene biomoléculas unidas al mismo, que comprende las etapas de
- 20 (a) unir las biomoléculas al portador sólido y
- (b) incubar el portador de la etapa (a) en la composición caracterizada en uno cualquiera de los puntos 1 a 9.
- 25 12. El método según el punto 10 u 11 que comprende, además
- (c) someter el portador sólido a secado.
13. El método según uno cualquiera de los puntos 10 a 12, que comprende además esterilizar el portador sólido después de la etapa (b) o después de la etapa (c).
- 30 14. Un portador sólido que se puede producir o producido mediante el método según uno cualquiera de los puntos 11 a 13.
- 35 15. El portador sólido del punto 14, en el que las biomoléculas son proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, ácidos grasos, polialcoholes y combinaciones o modificaciones de los mismos, en el que las proteínas son preferiblemente anticuerpos, enzimas, receptores, citocinas, hormonas, proteínas de membrana, factores de crecimiento, albúminas, globulinas, proteínas de transporte o factores de coagulación sanguínea.
- 40 16. El portador sólido del punto 14 o 15, en el que las biomoléculas se unen específicamente a una proteína marcadora indicativa de una enfermedad, un patógeno no celular, una célula o una toxina.
17. Uso de un portador sólido según uno cualquiera de los puntos 14 a 16 para la preparación de un dispositivo médico.
- 45 18. Uso según el punto 17, en el que el dispositivo médico es un implante, un tubo, un catéter, una endoprótesis, un tubo, un apósito de heridas o un dispositivo médico usado en circulación extracorpórea.
19. El método según el punto 13 en el que la esterilización del portador se efectúa mediante óxido de etileno, radiación beta, radiación gamma, rayos X, inactivación térmica, autoclavado o esterilización con plasma.
- 50 20. Un método para diagnosticar una enfermedad que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto una muestra obtenida de un paciente con un portador sólido según el punto 16 en condiciones adecuadas para permitir la unión específica de las biomoléculas unidas al portador a dicha proteína marcadora indicativa de una enfermedad, dicho patógeno no celular, dicha célula o dicha toxina; y
- 55 (b) detectar si dicha proteína marcadora indicativa de la enfermedad, dicho patógeno no celular, dicha célula o dicha toxina se ha unido a las biomoléculas.
- 60

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende al menos tres aminoácidos diferentes para estabilizar biomoléculas inmovilizadas sobre un portador sólido.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que las biomoléculas se unen reversiblemente sobre dicho portador sólido.
3. Uso según la reivindicación 1 o 2, en el que estabilizar las biomoléculas incluye estabilizar la estructura y/o actividad de las biomoléculas, potenciar la vida útil de almacenamiento de las biomoléculas y/o proteger las biomoléculas frente al daño mediado por estrés.
4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la composición comprende al menos 4 o al menos 5 aminoácidos diferentes.
5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la composición comprende al menos un aminoácido de cada grupo de,
 - (a) un aminoácido con grupos R no polares, alifáticos;
 - (b) un aminoácido con grupos R polares, no cargados;
 - (c) un aminoácido con grupos R cargados positivamente;
 - (d) un aminoácido con grupos R cargados negativamente; y
 - (e) unos aminoácidos con grupos R aromáticos.
6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los aminoácidos comprendidos en la composición se seleccionan de
 - (a) alanina, glutamato, lisina, treonina y triptófano;
 - (b) aspartato, arginina, fenilalanina, serina y valina;
 - (c) prolina, serina, asparagina, aspartato, treonina y fenilalanina;
 - (d) tirosina, isoleucina, leucina, treonina y valina; y
 - (e) arginina, glicina, histidina, alanina, glutamato, lisina y triptófano.
7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la composición comprende menos del 1% en peso seco de cisteína dentro de la mezcla de al menos tres aminoácidos.
8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la composición comprende además menos del 1%, más preferiblemente menos del 0,3% de Tween, preferiblemente Tween 80.
9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la composición comprende además una saponina, en el que preferiblemente la saponina es ácido glicirrónico o un derivado del mismo.
10. Un método para producir biomoléculas estabilizadas, que comprende
 - (a) unir las biomoléculas a un portador sólido y
 - (b) incrustar las biomoléculas en la composición caracterizada en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, de modo que las biomoléculas incrustadas se cubren parcial o completamente mediante la composición caracterizada en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Método de producción de un portador sólido que tiene biomoléculas unidas al mismo, que comprende las etapas de
 - (a) unir las biomoléculas al portador sólido y
 - (b) incubar el portador de la etapa (a) en la composición caracterizada en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

12. Método según la reivindicación 10 u 11, que comprende, además
(c) someter el portador sólido a secado.
- 5 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende además esterilizar el portador sólido tras la etapa (b) o tras la etapa (c), en el que la esterilización del portador se efectúa mediante óxido de etileno, radiación beta, radiación gamma, rayos X, inactivación térmica, autoclavado o esterilización con plasma.
- 10 14. Portador sólido que se puede producir o producido mediante el método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que las biomoléculas son proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, ácidos grasos, polialcoholes o combinaciones o modificaciones de los mismos, en el que las proteínas son preferiblemente anticuerpos, enzimas, receptores, citocinas, hormonas, proteínas de membrana, factores de crecimiento, albúminas, globulinas, proteínas de transporte o factores de coagulación sanguínea, y en el que las biomoléculas se unen reversiblemente sobre dicho portador sólido y/o se unen directamente a dicho portador sólido.
- 15 15. Portador sólido según la reivindicación 14, en el que las biomoléculas se unen específicamente a una proteína marcadora indicativa de una enfermedad, un patógeno no celular, una célula o una toxina.
- 20 16. Uso de un portador sólido según la reivindicación 14 o 15 para la preparación de un dispositivo médico.
17. Uso según la reivindicación 16, en el que el dispositivo médico es un implante, un tubo, un catéter, una endoprótesis, un apósito de heridas o un dispositivo médico usado en circulación extracorpórea.
- 25 18. Método para diagnosticar una enfermedad que comprende las etapas de:
- 30 (a) poner en contacto una muestra obtenida de un paciente con un portador sólido según la reivindicación 15 en condiciones adecuadas para permitir la unión específica de las biomoléculas unidas al portador a dicha proteína marcadora indicativa de una enfermedad, dicho patógeno no celular, dicha célula o dicha toxina; y
- (b) detectar si dicha proteína marcadora indicativa de la enfermedad, dicho patógeno no celular, dicha célula o dicha toxina se ha unido a las biomoléculas.
- 35

Figura 1

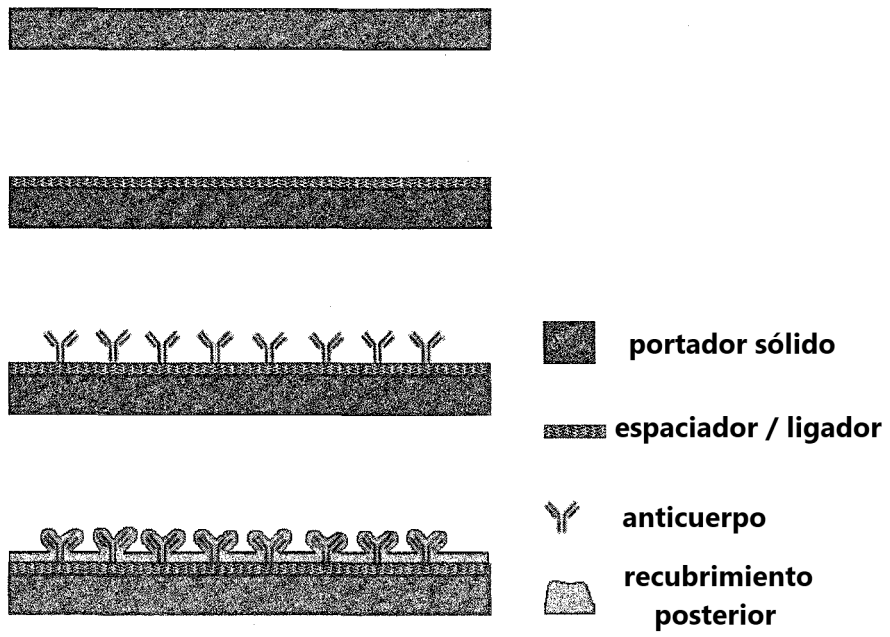


Figura 2

**Funcionalidad de LO-MM-3 tras esterilización (irradiado con 25 kGy):
recubrimientos posteriores que consisten en
de 2 a 5 aminoácidos**

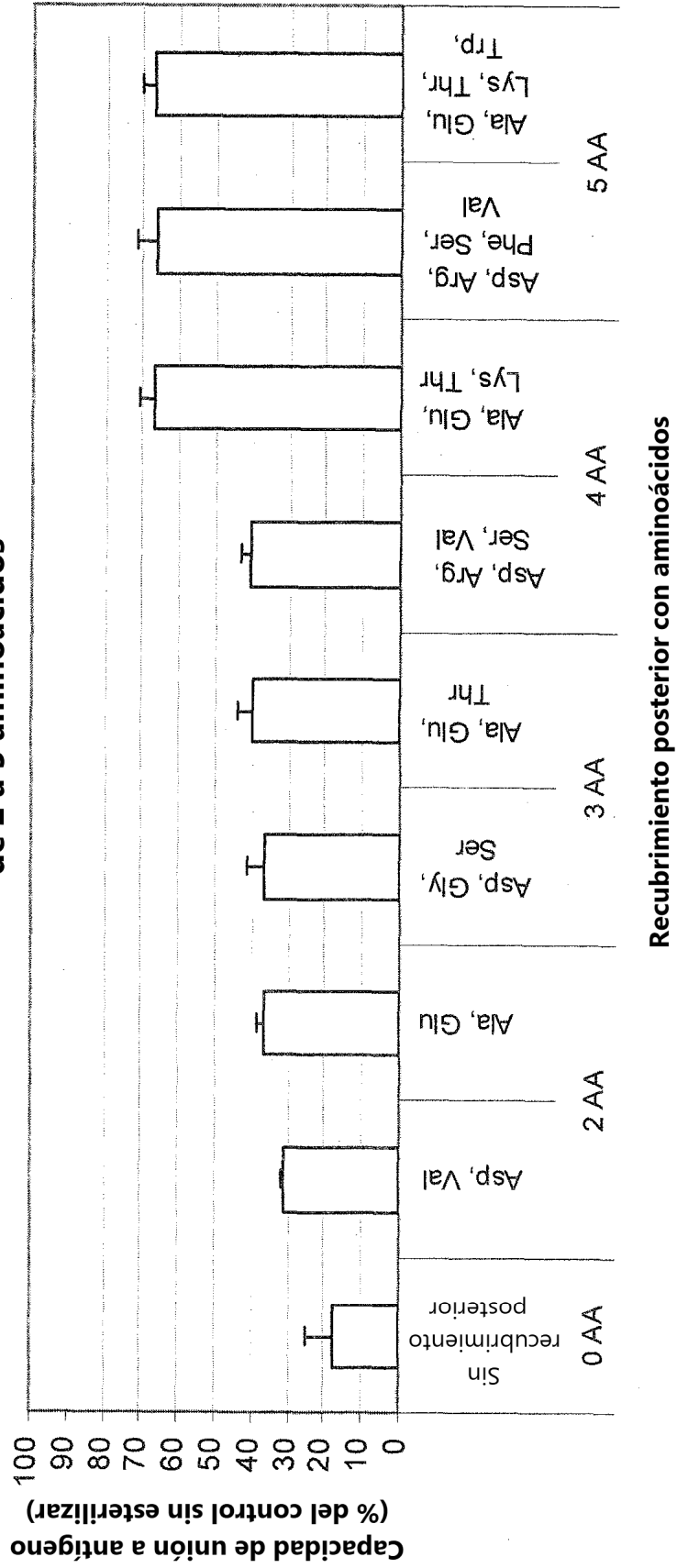
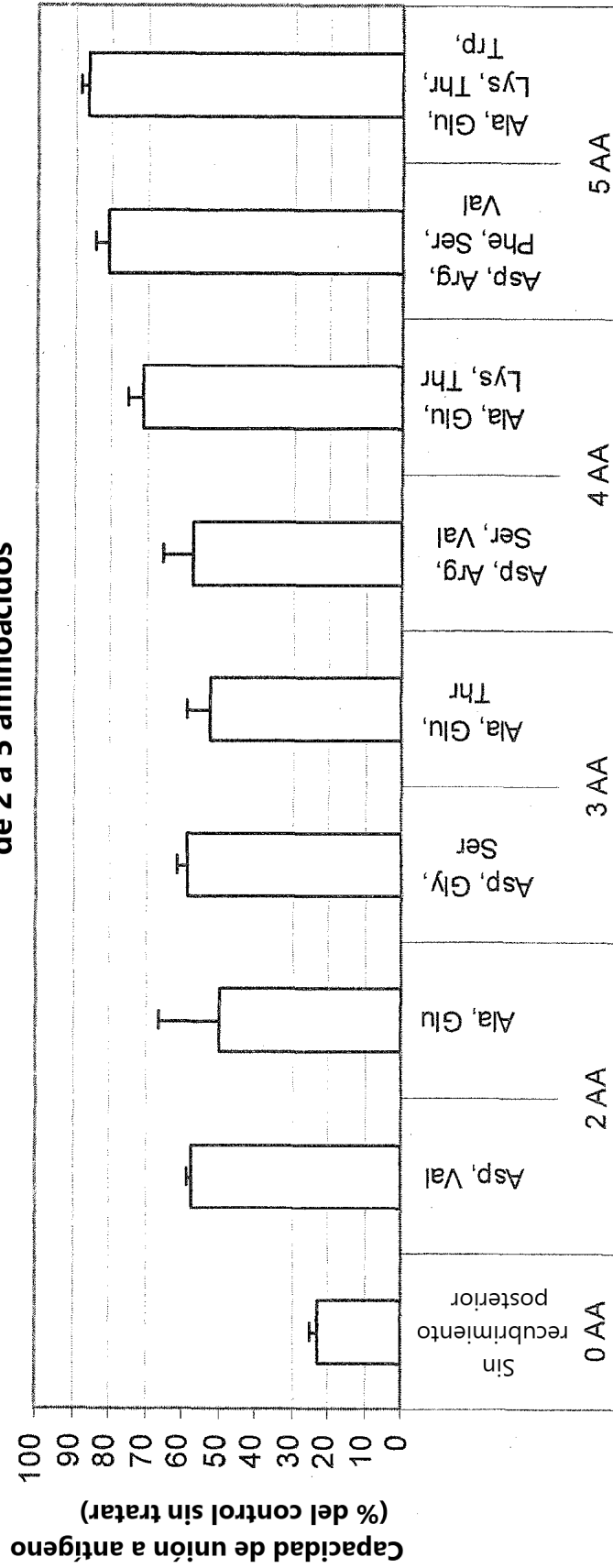


Figura 3

**Funcionalidad de LO-MM-3 tras envejecimiento acelerado
(7 días a 45°C es igual a 16 semanas a 5°C):
recubrimientos posteriores que consisten en
de 2 a 5 aminoácidos**



Recubrimiento posterior con aminoácidos

Figura 4

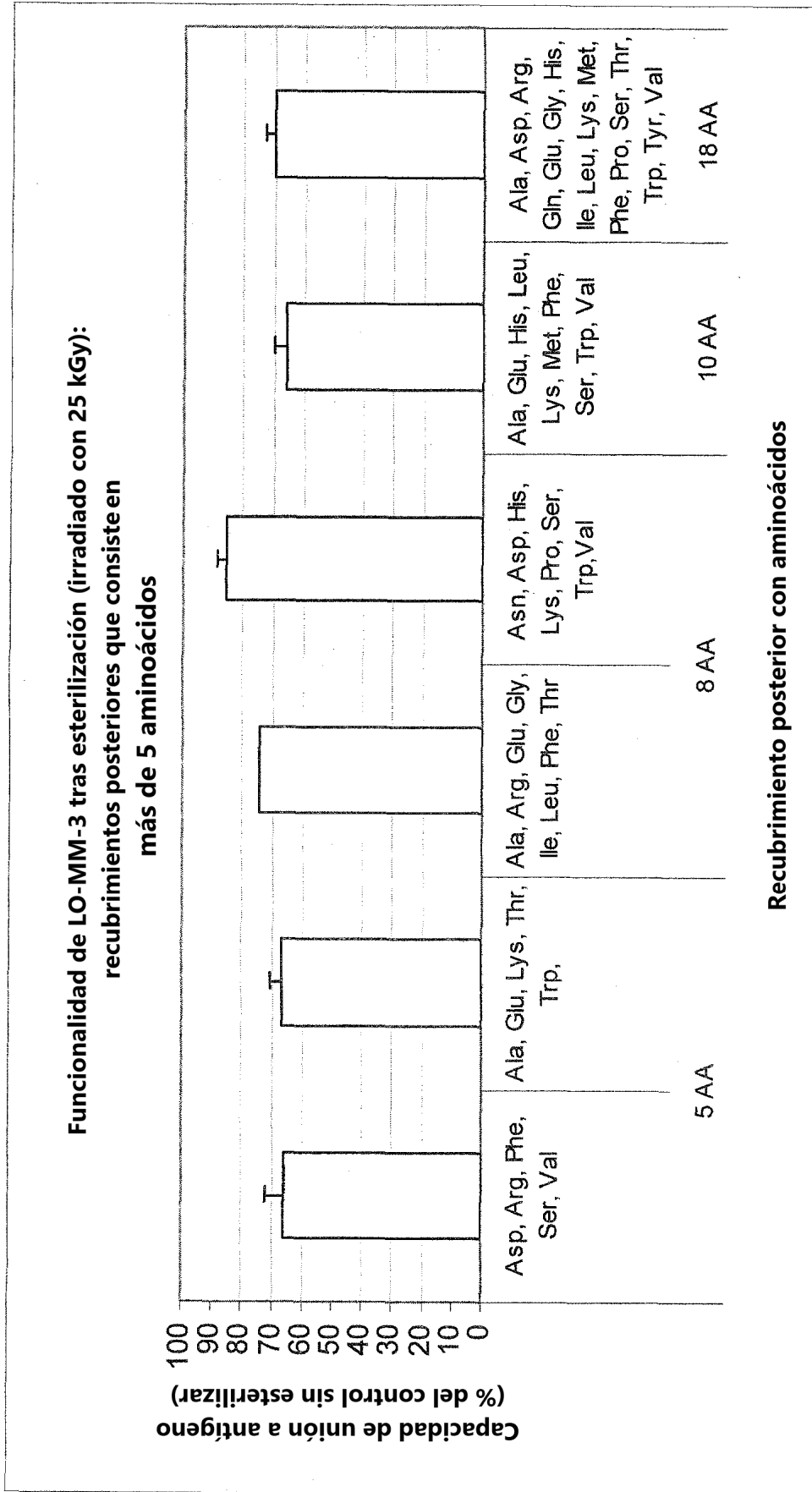
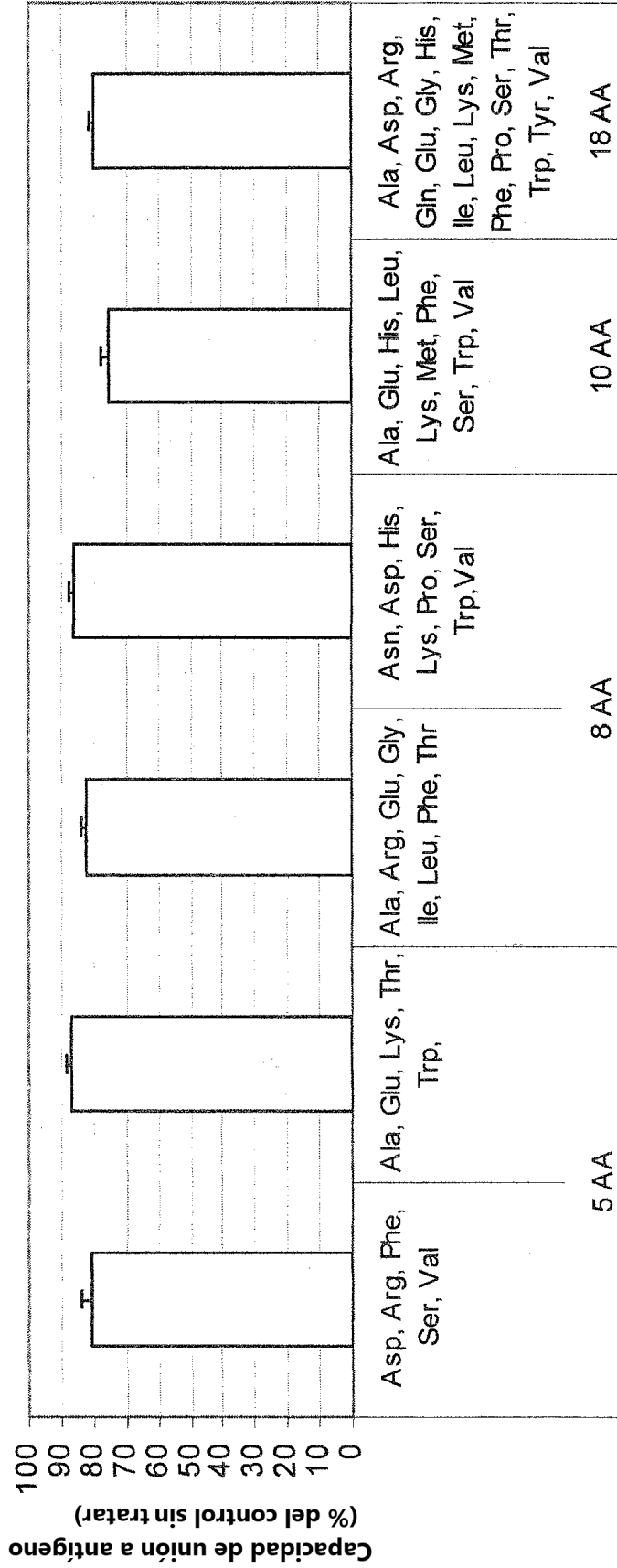


Figura 5

**Funcionalidad de LO-MM-3 tras envejecimiento acelerado
(7 días a 45°C es igual a 16 semanas a 5°C):
recubrimientos posteriores que consiste en
más de 5 aminoácidos**



Recubrimiento posterior con aminoácidos

Figura 6

Funcionalidad de LO-MM-3 tras esterilización (irradiado con 25 kGy):
recubrimiento posterior que consiste en 4 aminoácidos
en comparación con los aminoácidos individuales

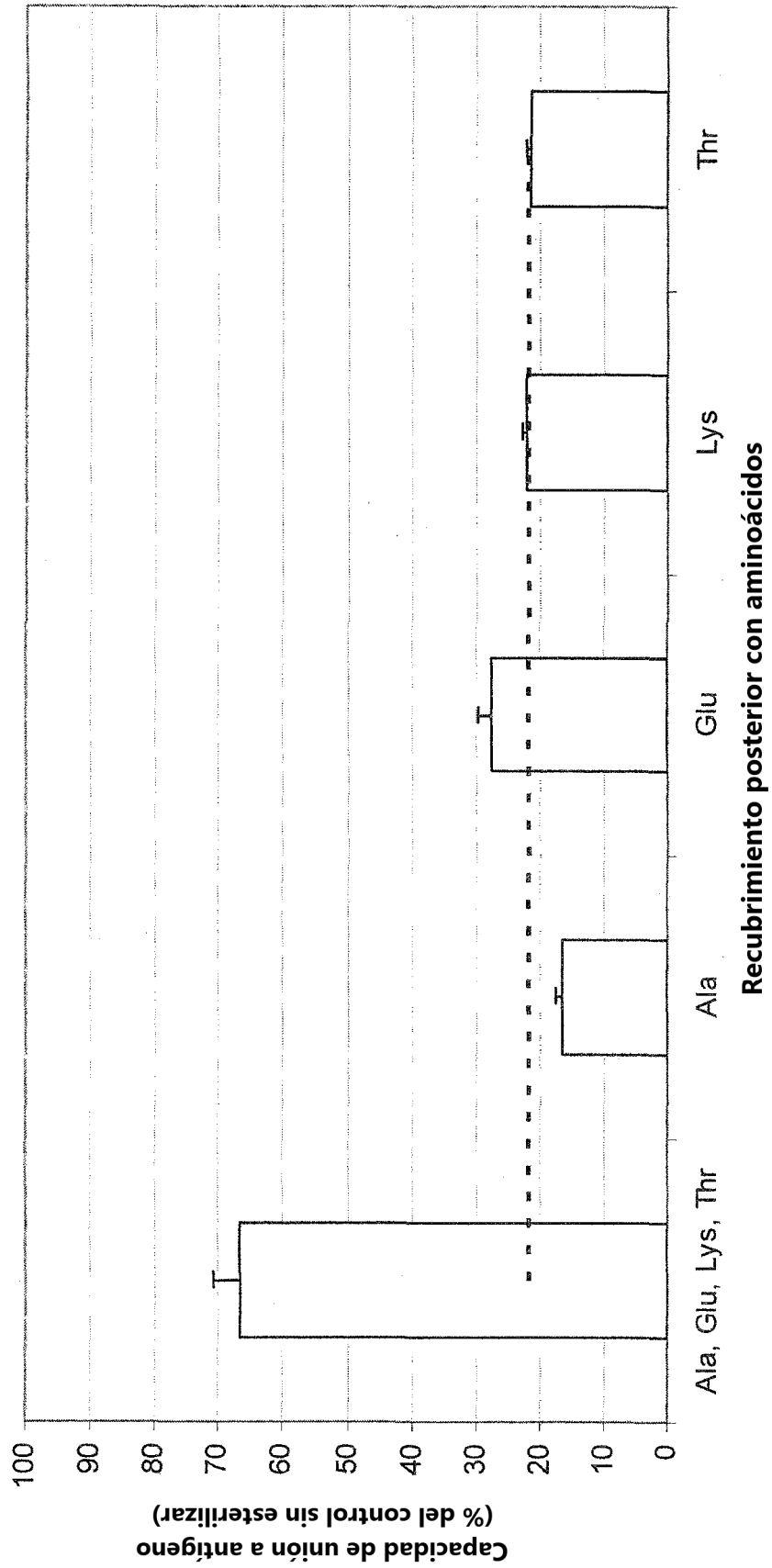


Figura 7

Funcionalidad de LO-MM-3 tras esterilización (irradiado con 25 kGy):
recubrimiento posterior que consiste en 8 aminoácidos
en comparación con los aminoácidos individuales

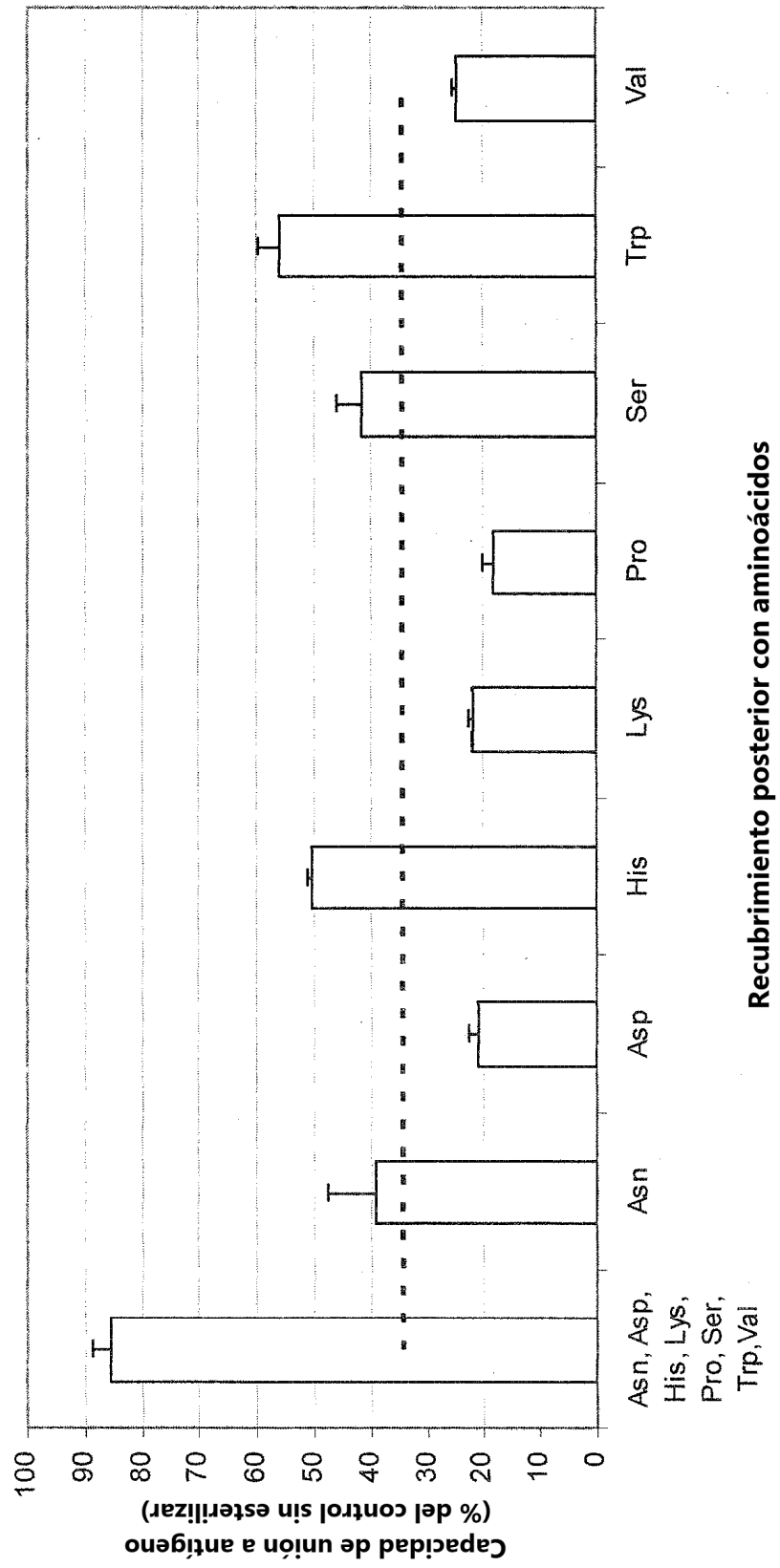


Figura 8

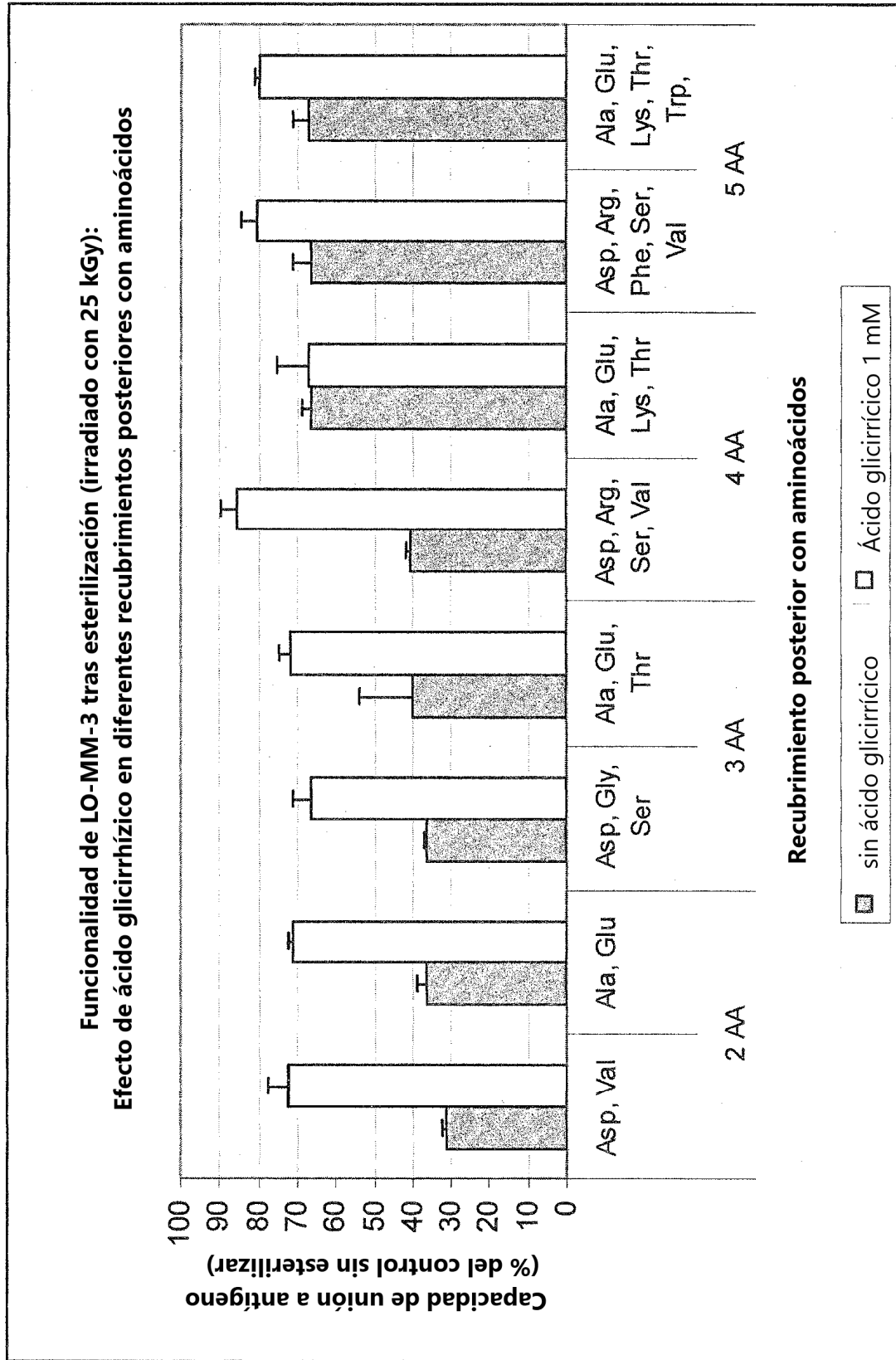


Figura 9

Funcionalidad de LO-MM-3 tras esterilización (irradiado con 25 kGy) y envejecimiento acelerado (7 días a 45°C es igual a 16 semanas a 5°C): protección de recubrimiento posterior con aminoácidos en comparación con sustancias estabilizantes convencionales

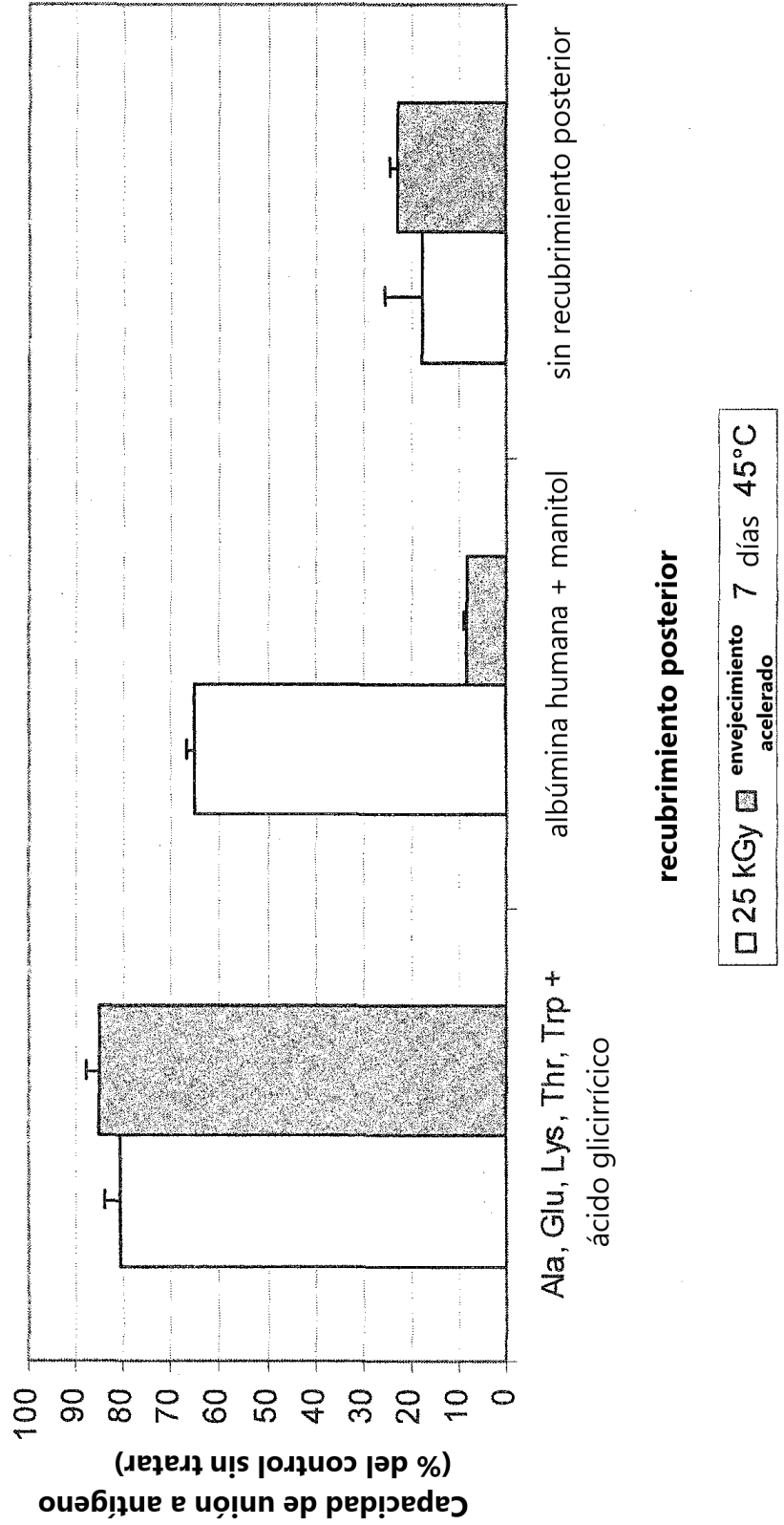


Figura 10

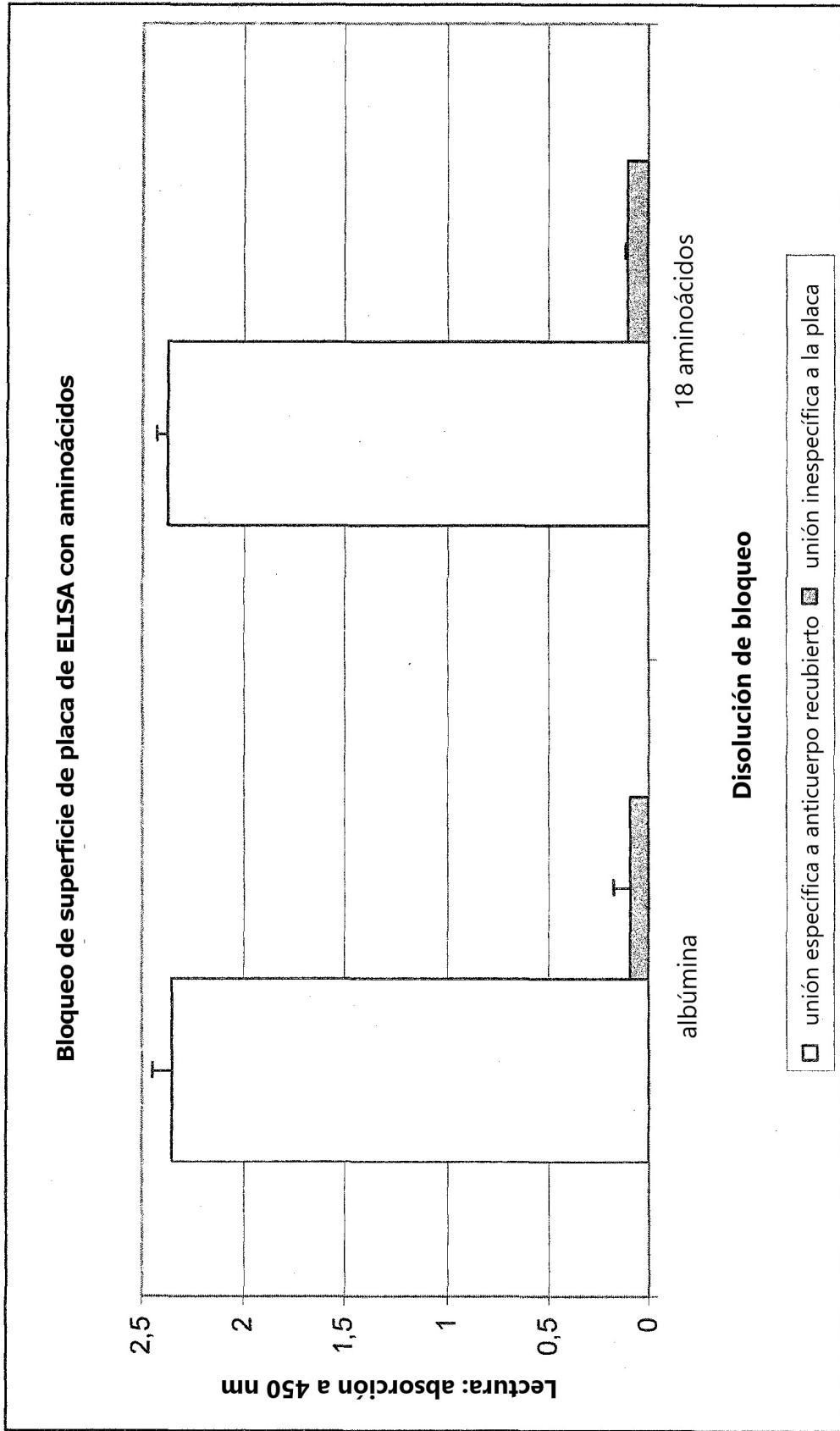


Figura 11

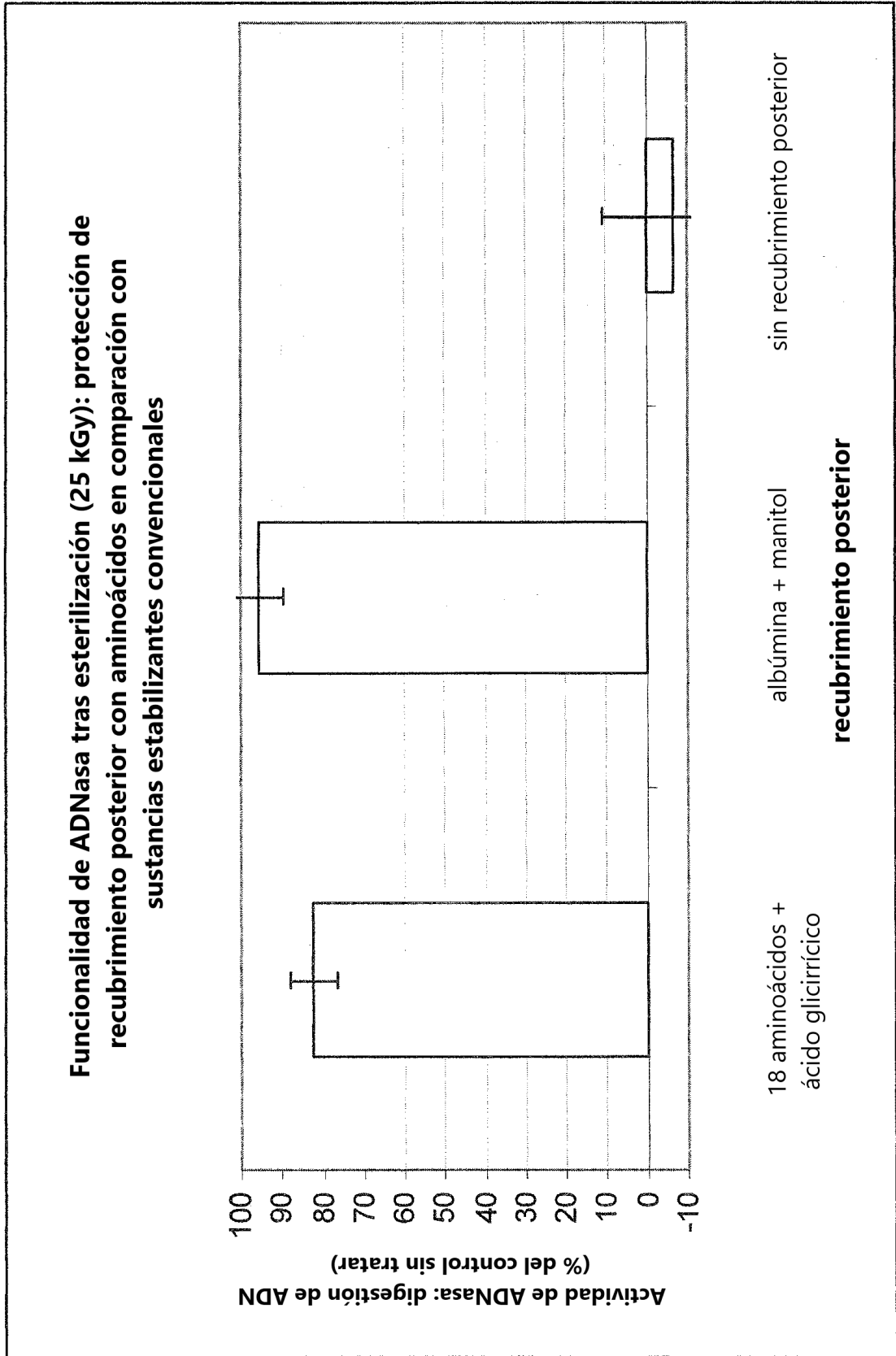


Figura 12

Funcionalidad de anticuerpo anti-TNF α humano (Infliximab) tras esterilización
 (irradiado con 25 kGy)
 y envejecimiento acelerado (6 días a 45°C es igual a 14 semanas a 5°C):
 protección de recubrimiento posterior con aminoácidos
 en comparación con sustancias estabilizantes convencionales

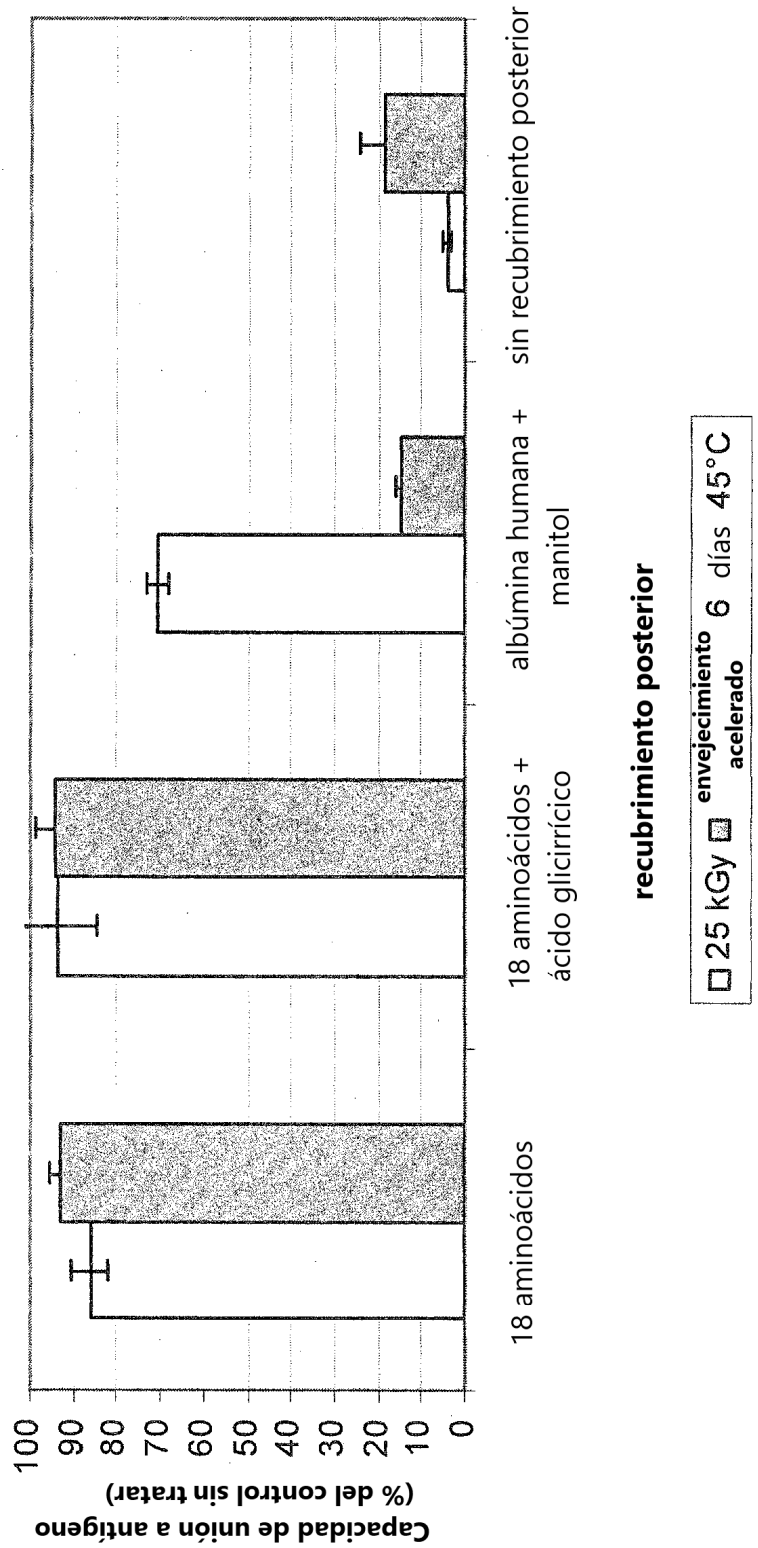


Figura 13

**Tinción de ADNbc intacto tras esterilización (irradiado con 25 kGy):
protección de recubrimientos posteriores con aminoácidos en
comparación con sustancias estabilizantes convencionales**

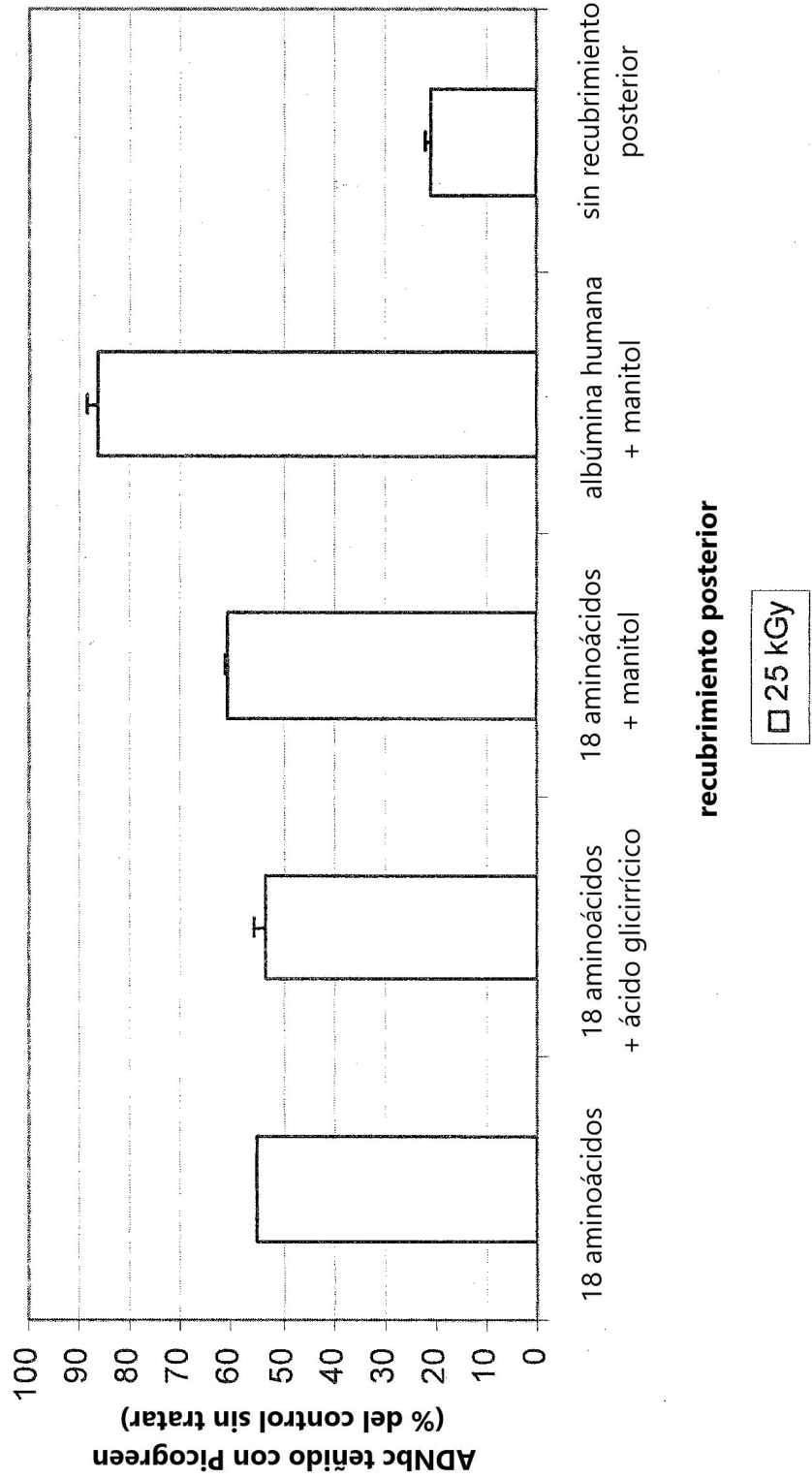


Figura 14

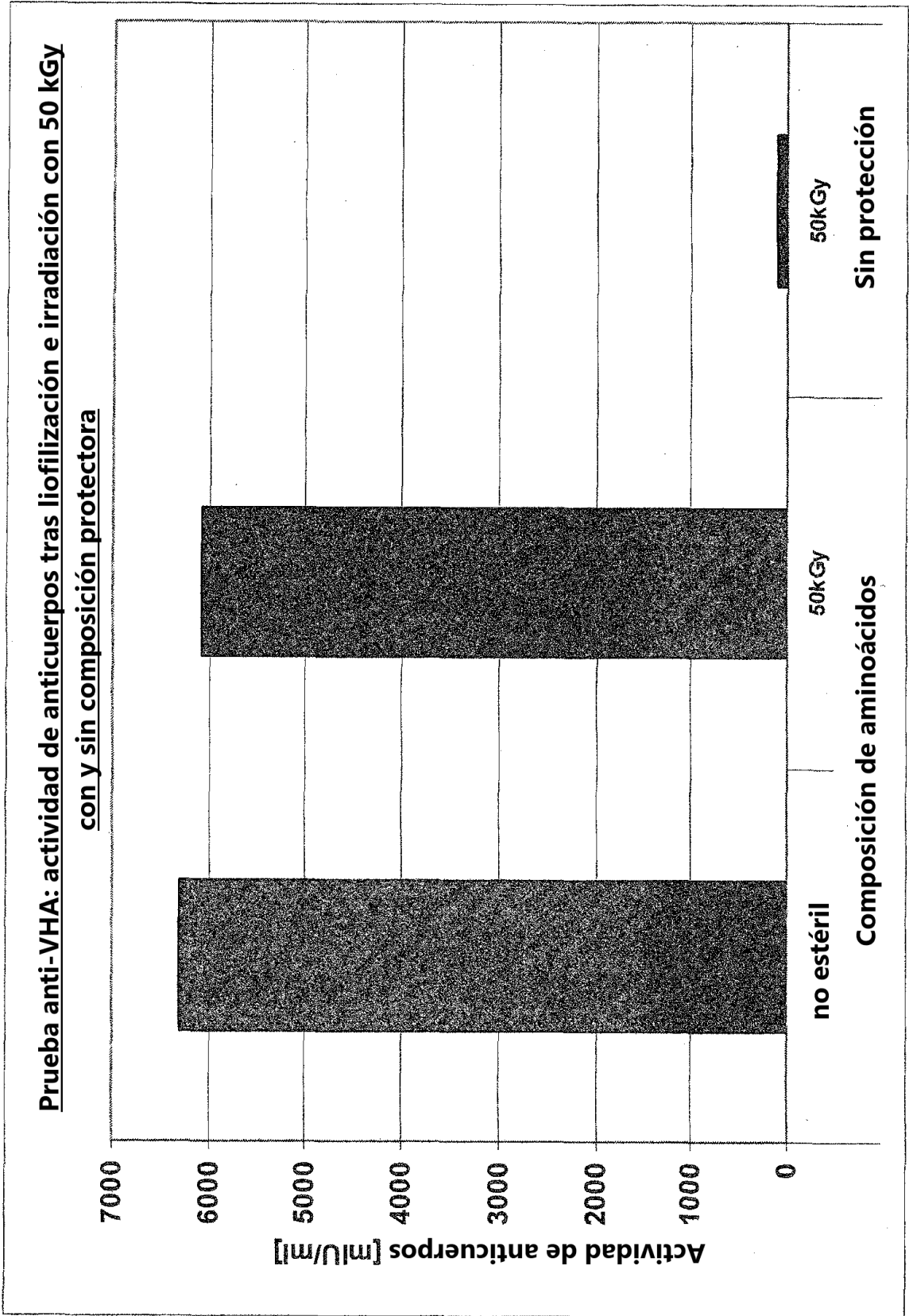


Figura 15

Actividad de anticuerpos tras irradiación con 50 kGy beta; prueba de saponinas como clase estructural para acción protectora

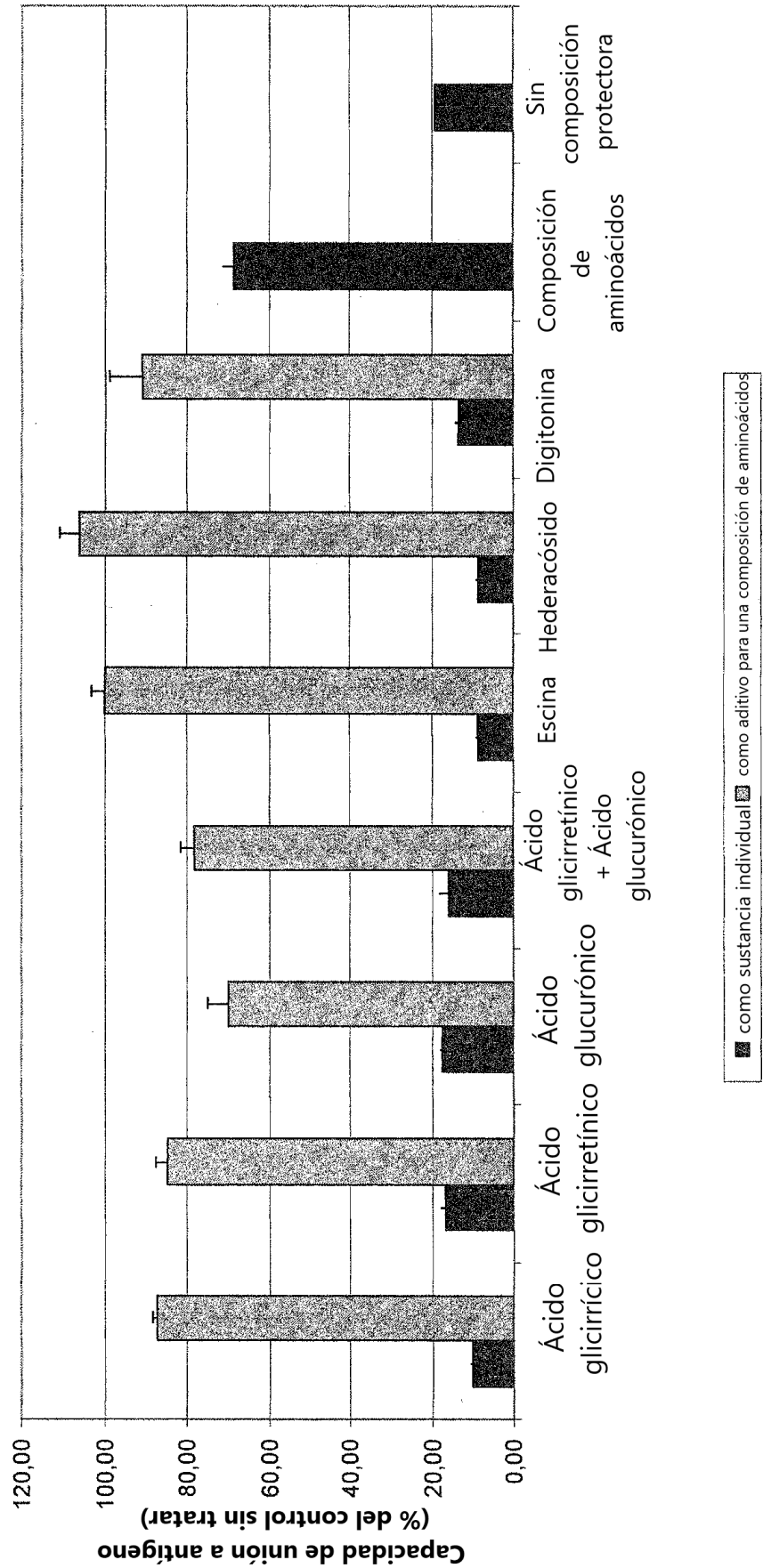


Figura 16

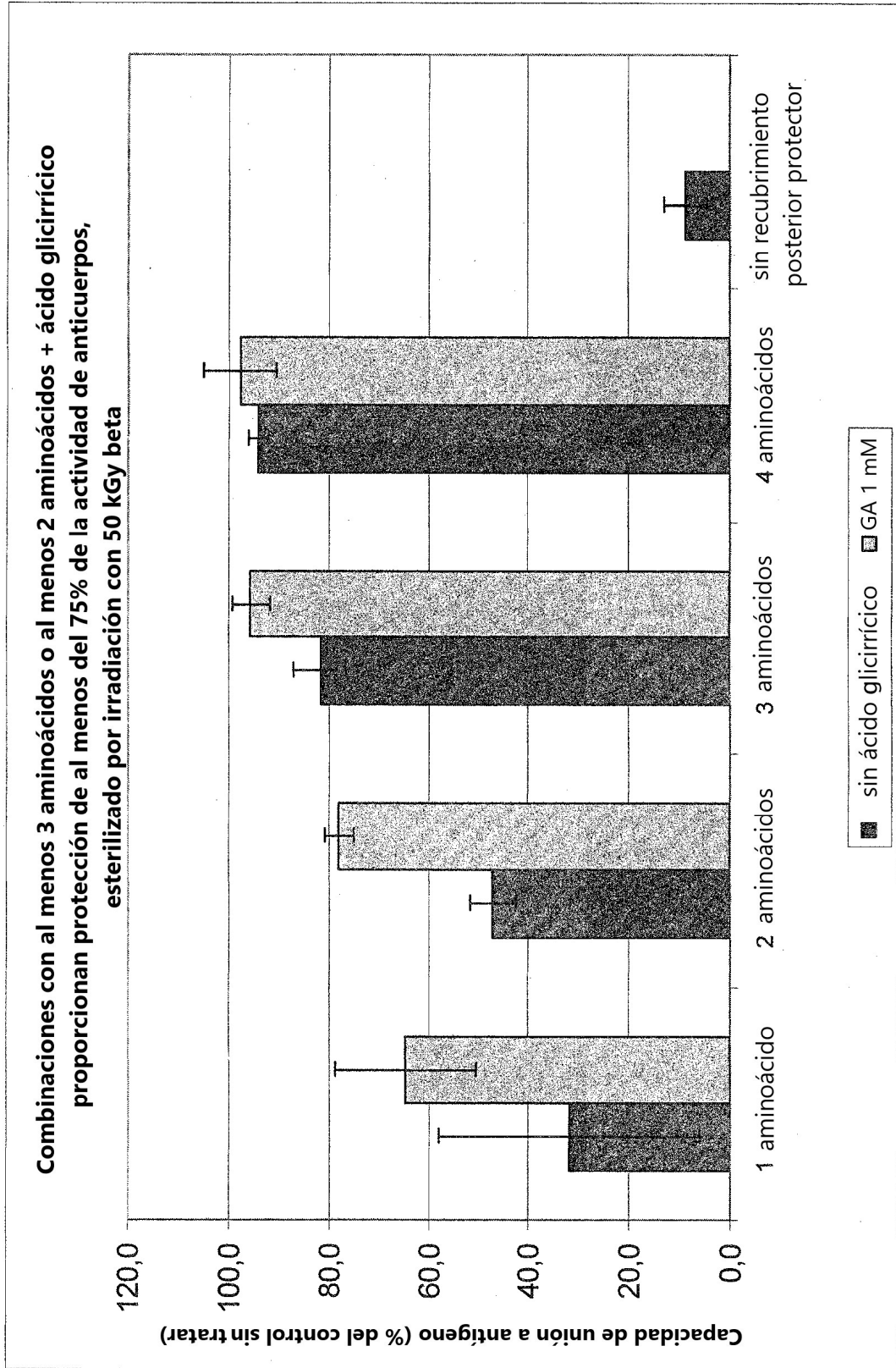


Figura 17

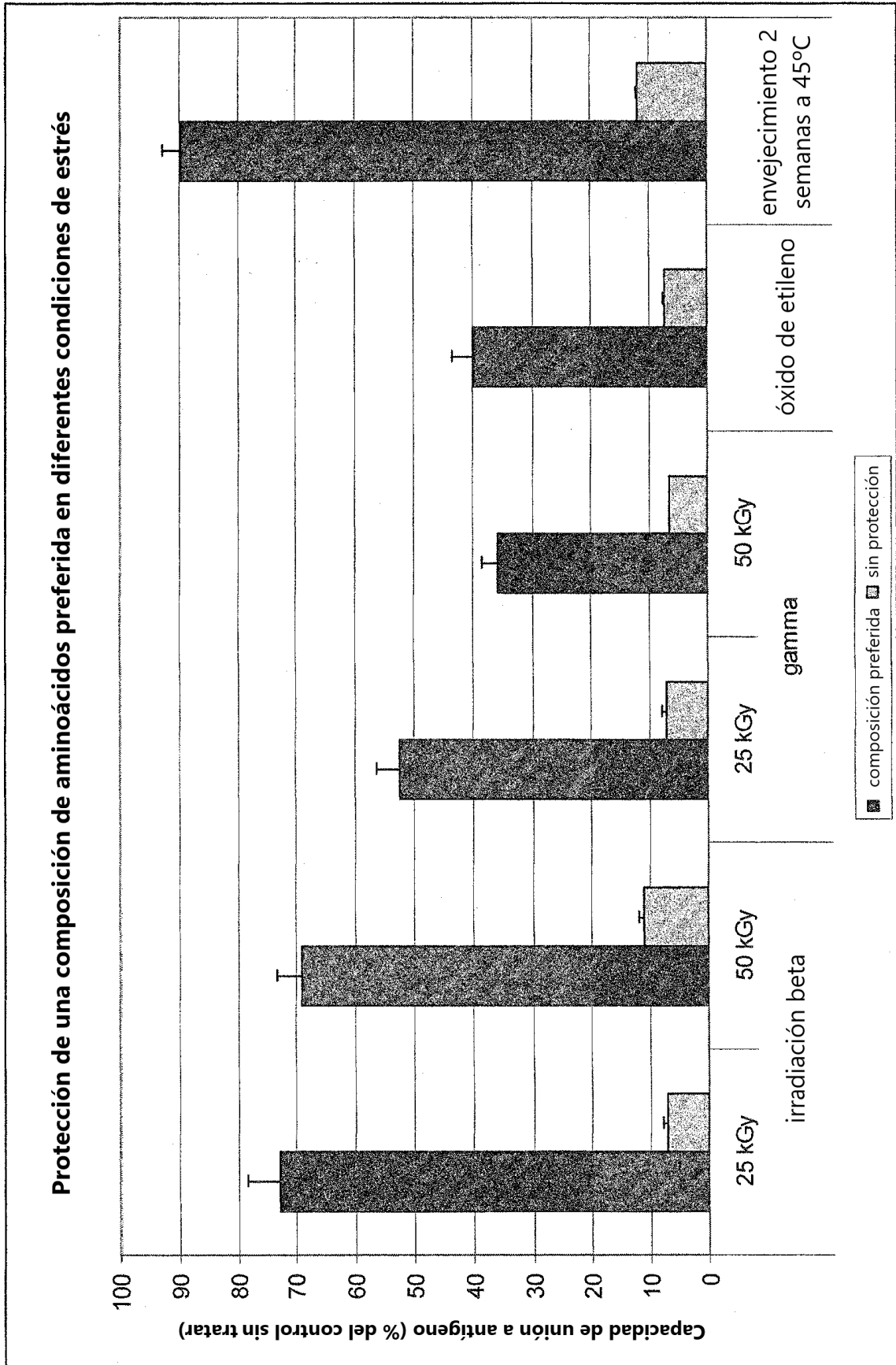


Figura 18

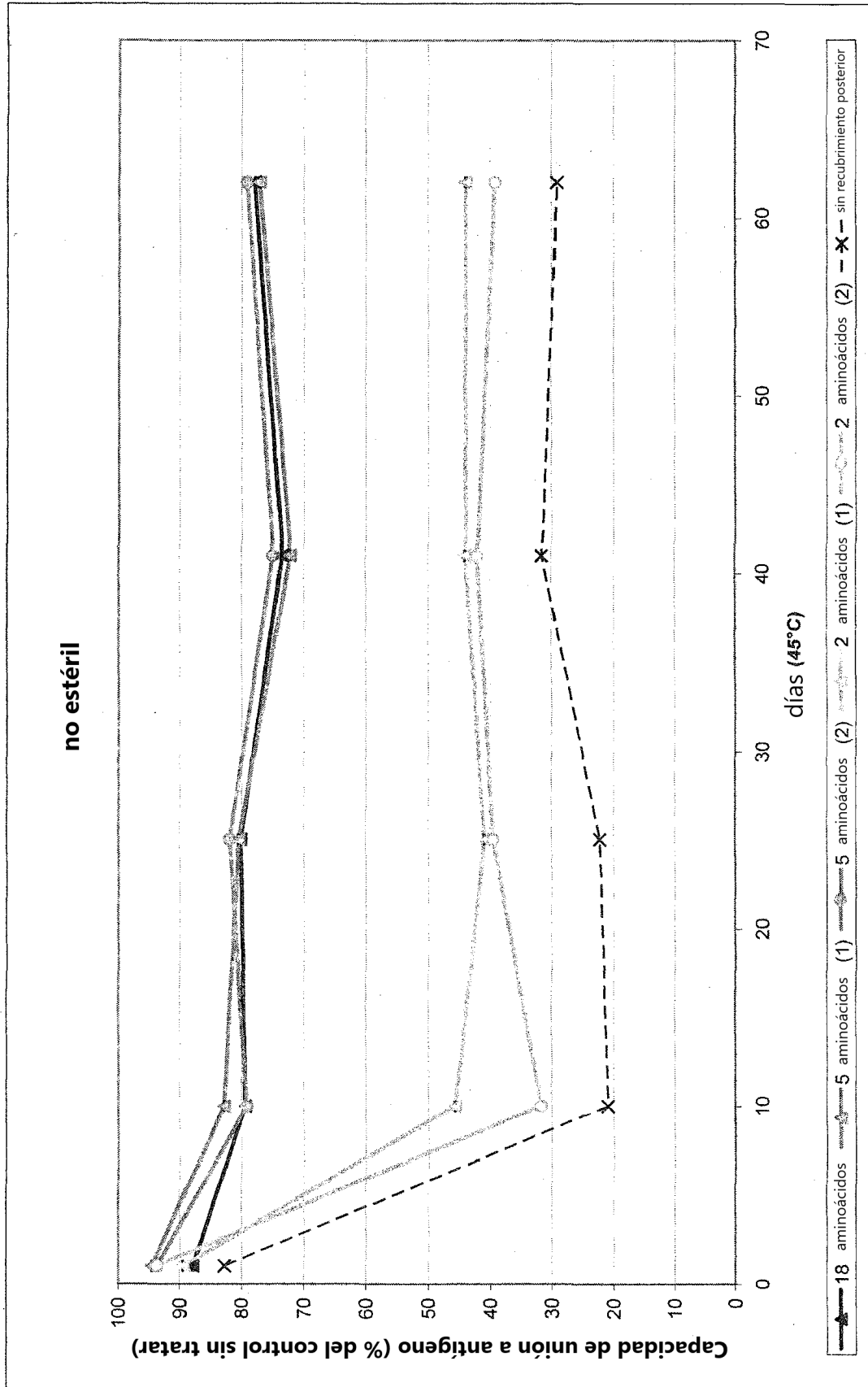


Figura 19

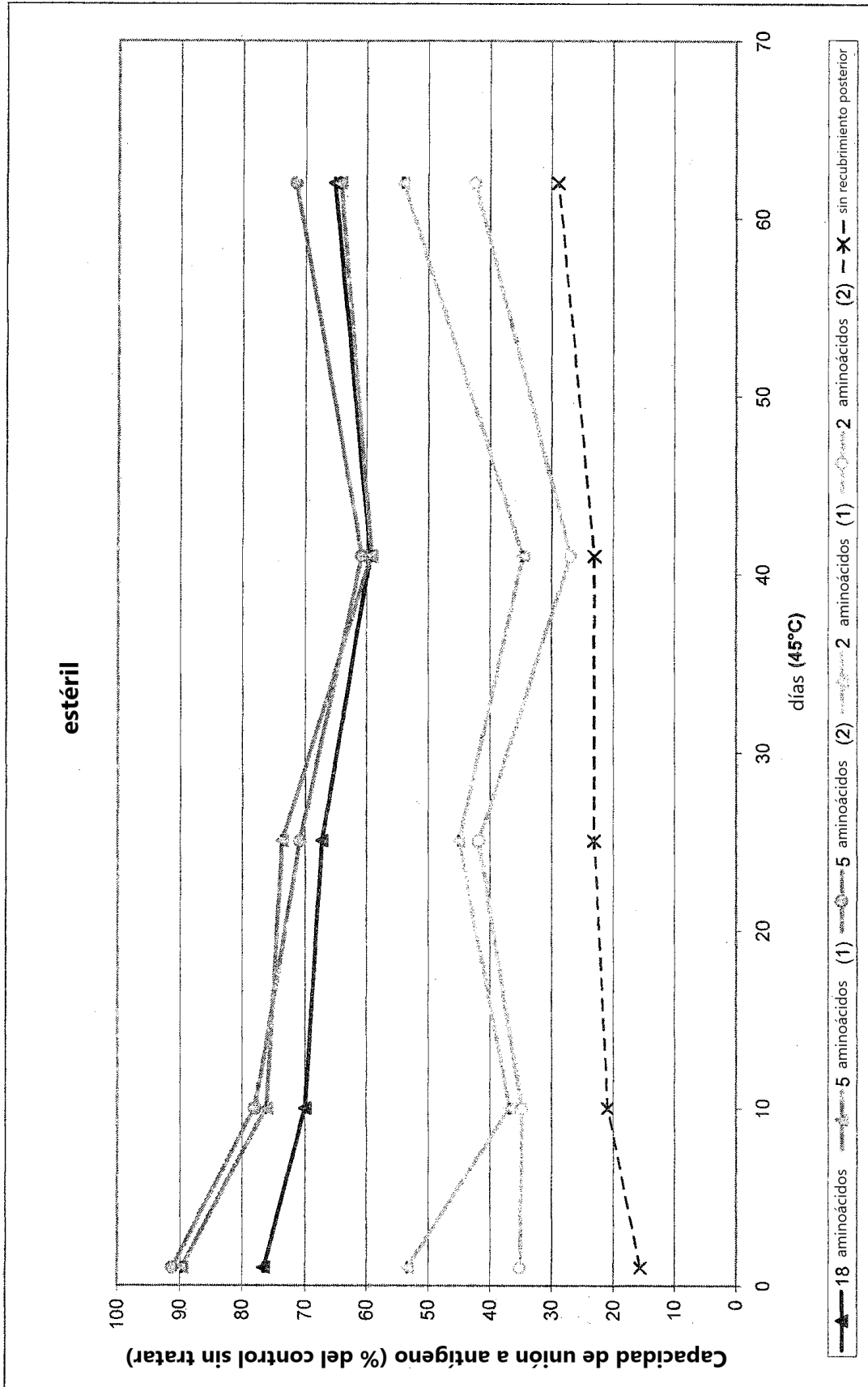
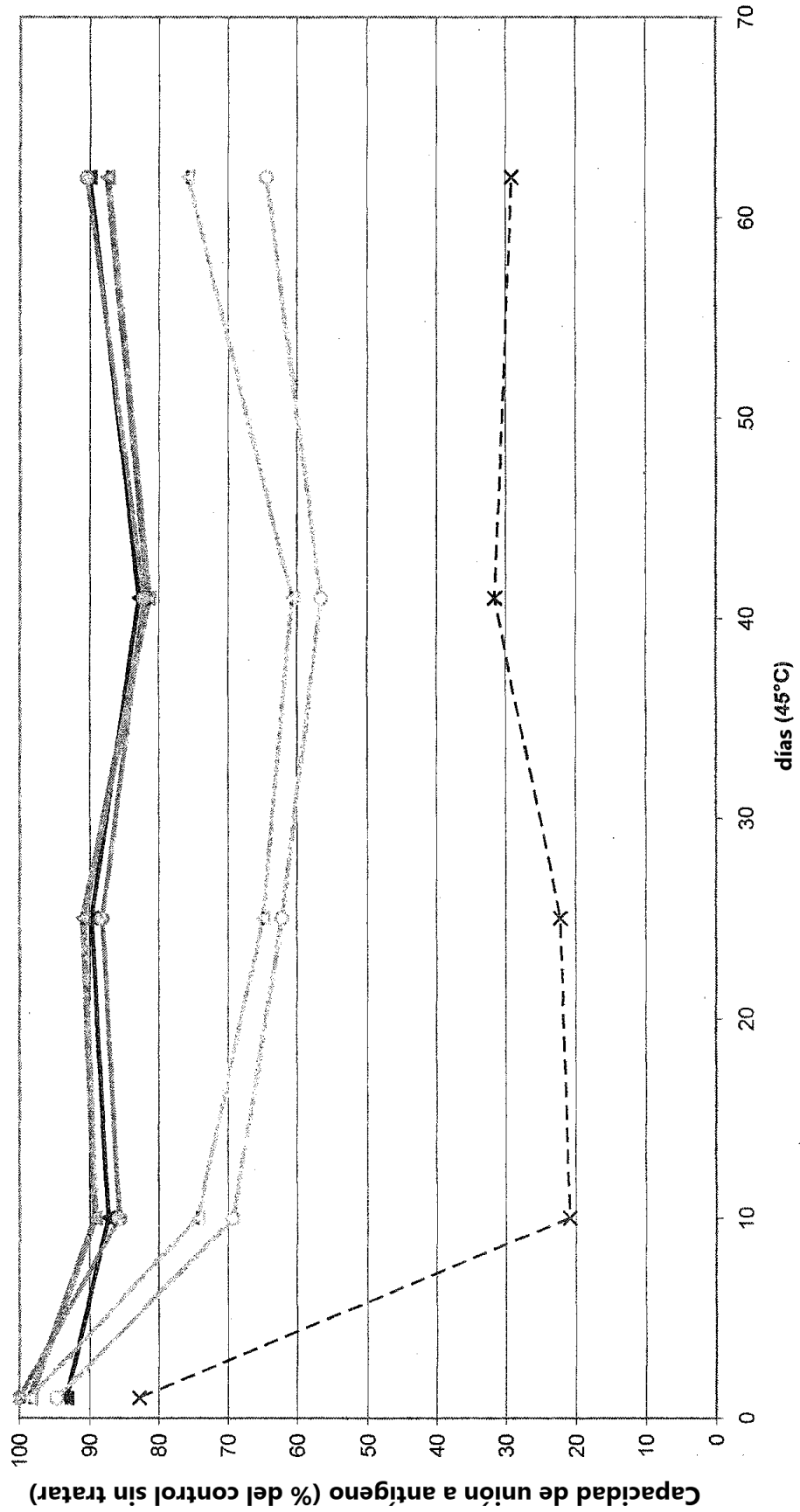


Figura 20

no estéril, recubrimientos posteriores con ácido glicirrónico



18 aminoácidos (1) 5 aminoácidos (2) 2 aminoácidos (2) X — sin recubrimiento posterior

Figura 21

estéril, recubrimientos posteriores con ácido glicirrónico

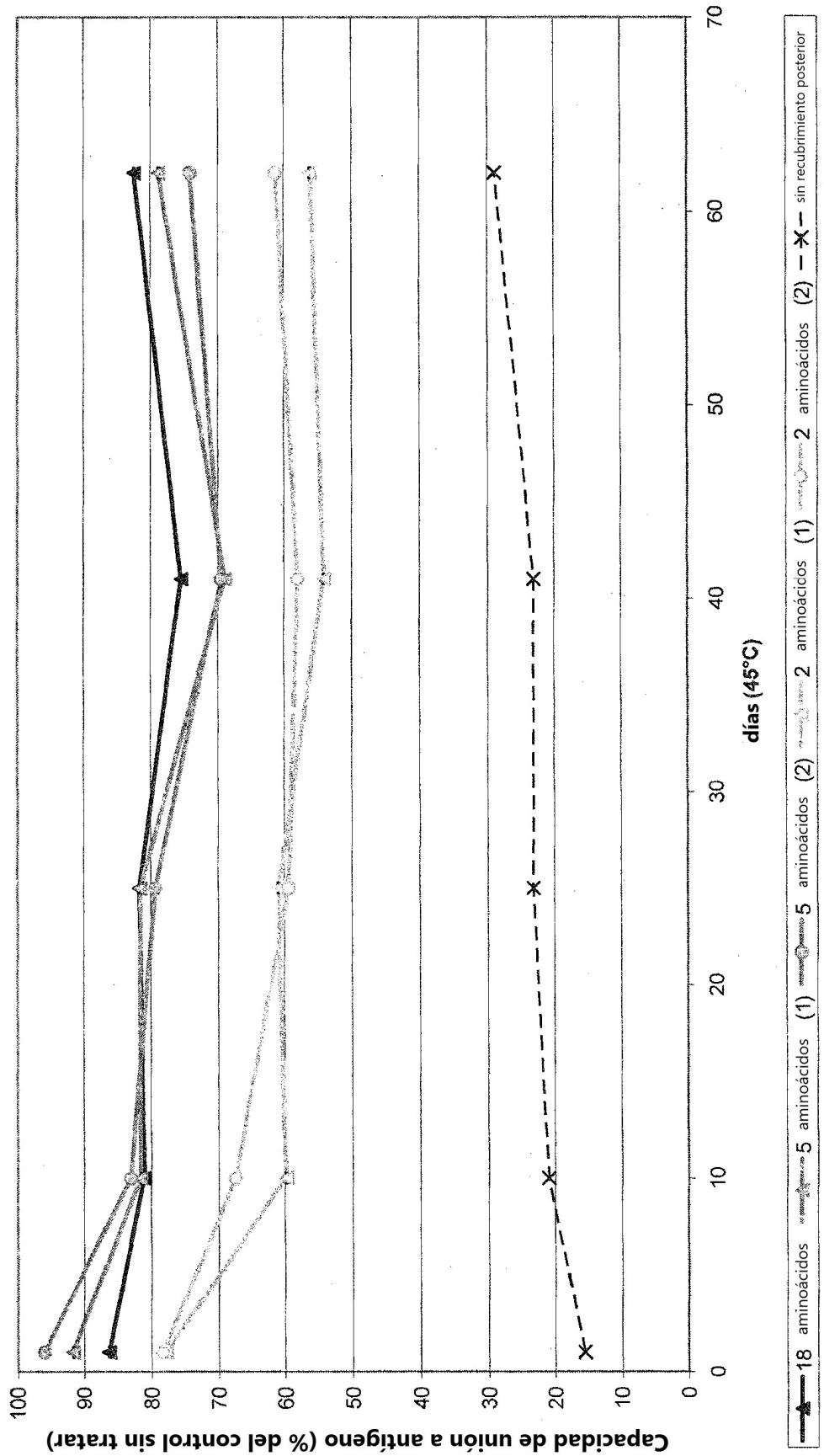


Figura 22

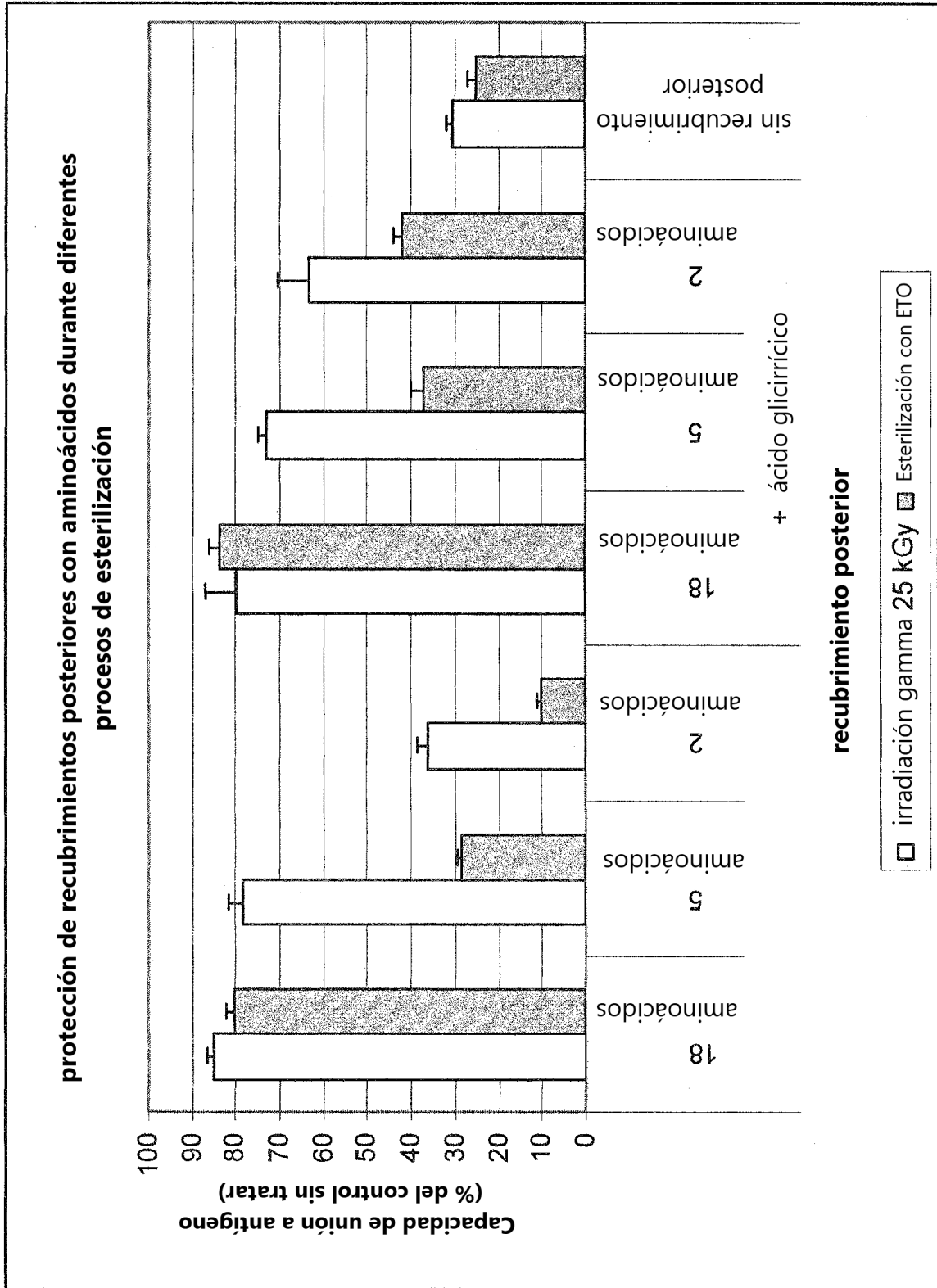


Figura 23

Combinaciones con aminoácidos y dipéptidos, esterilizadas por irradiación con 50 kGy beta

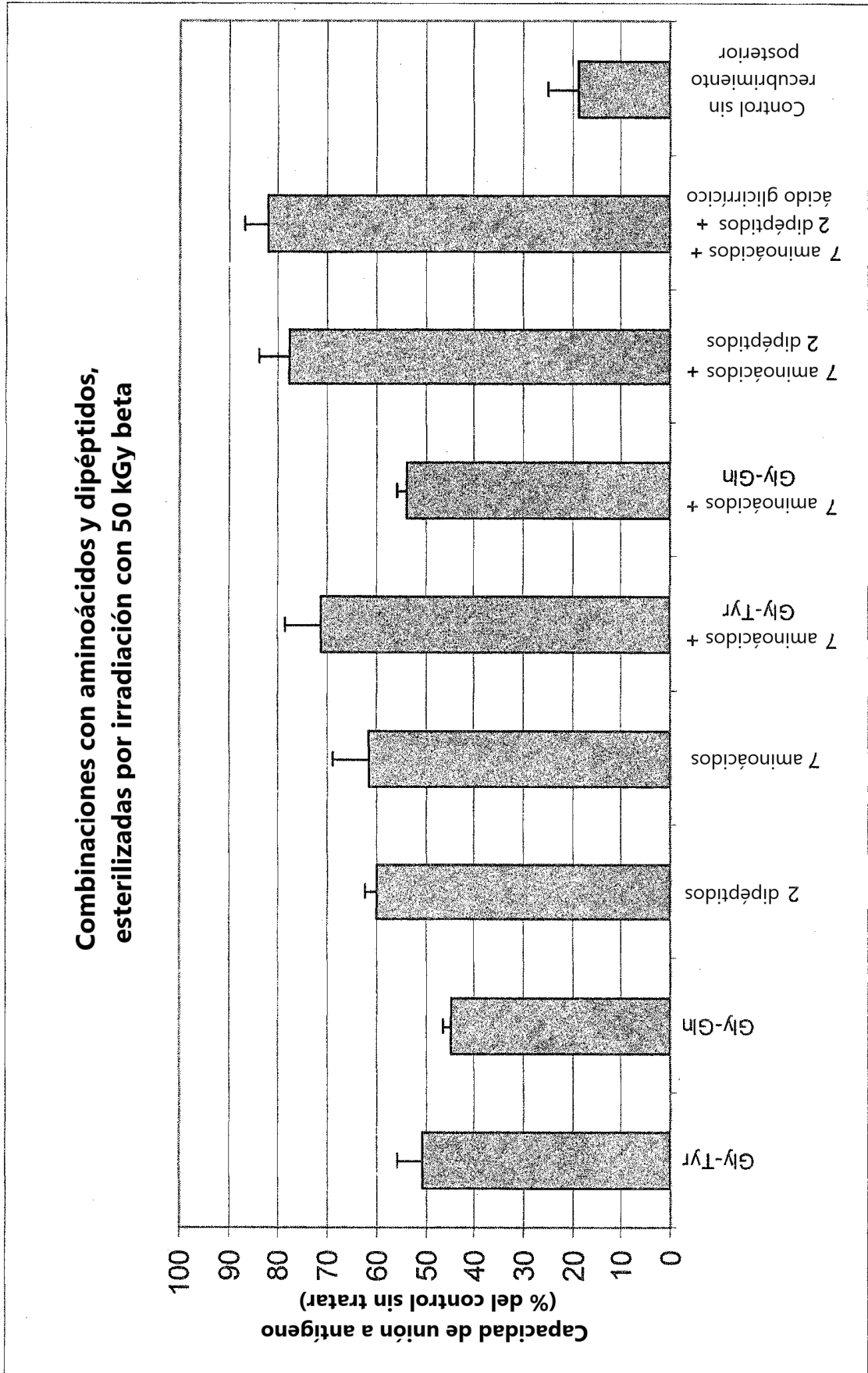


Figura 24

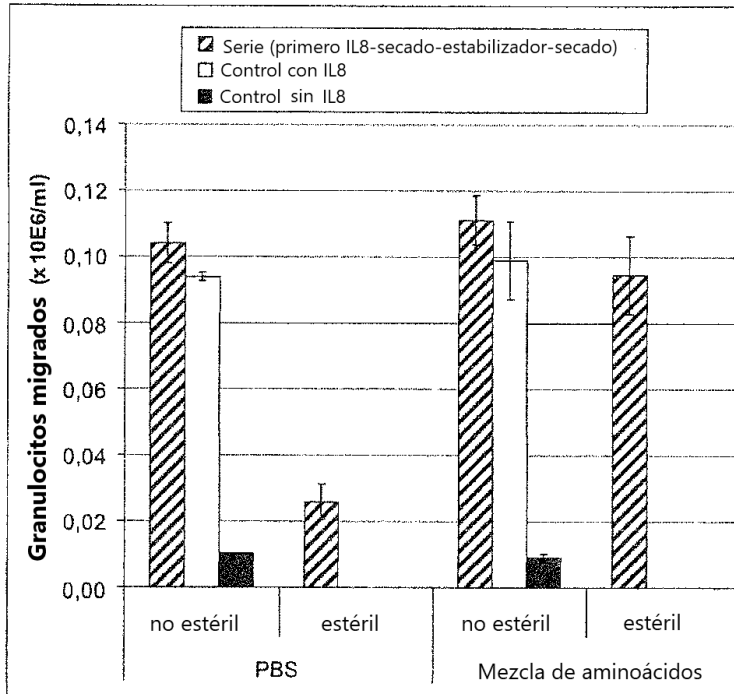


Figura 25

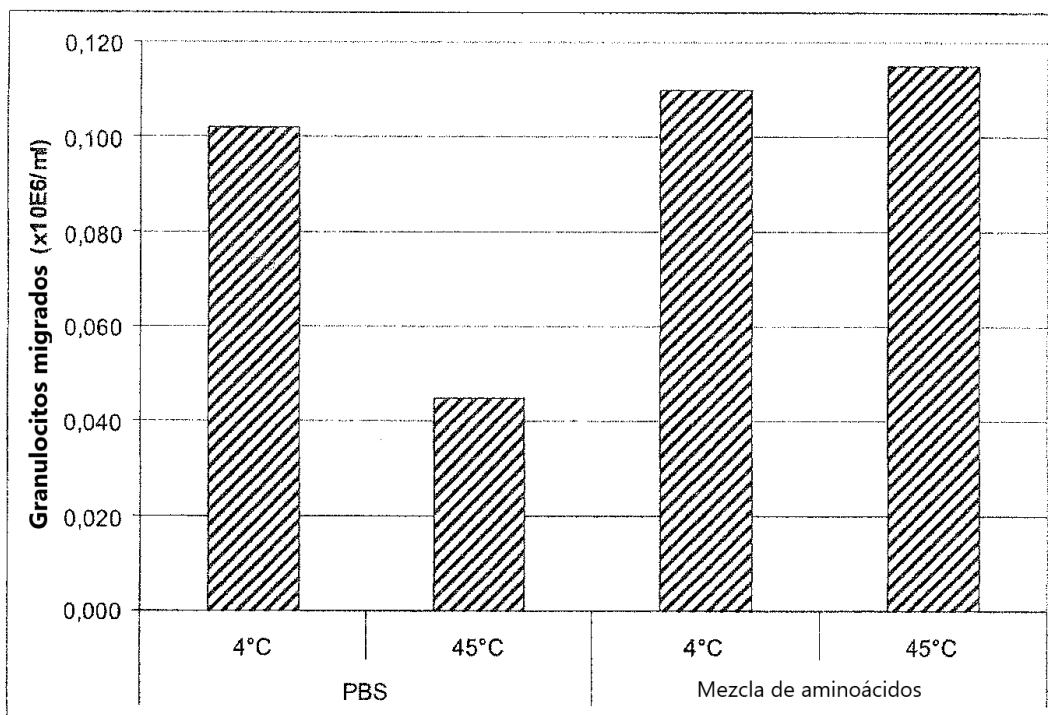


Figura 26

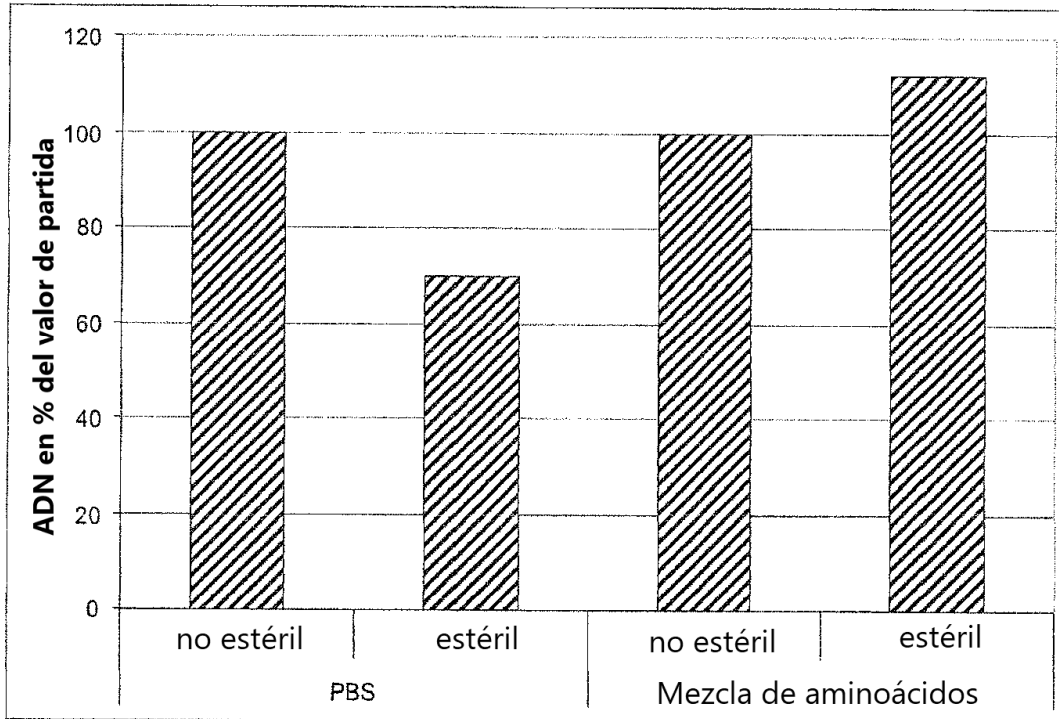


Figura 27

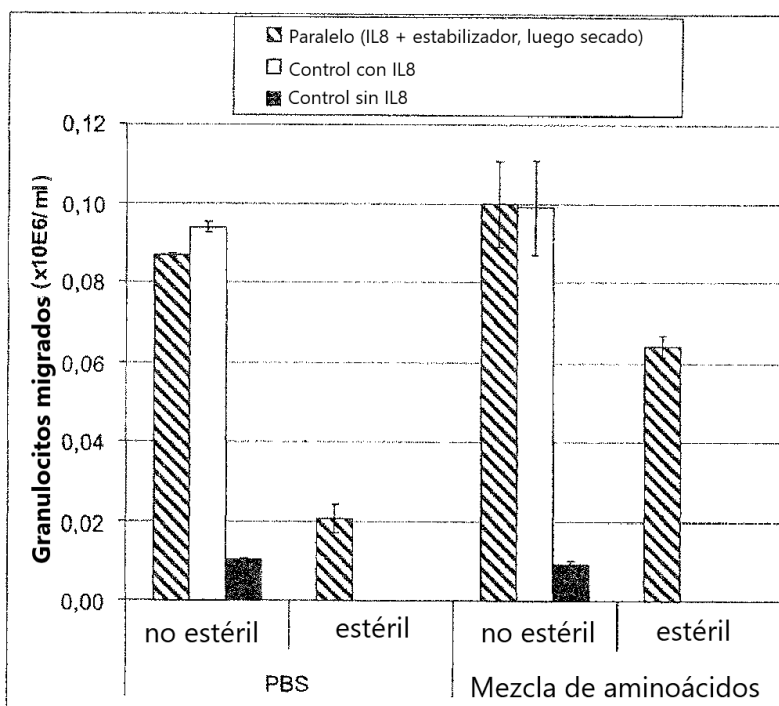


Figura 28

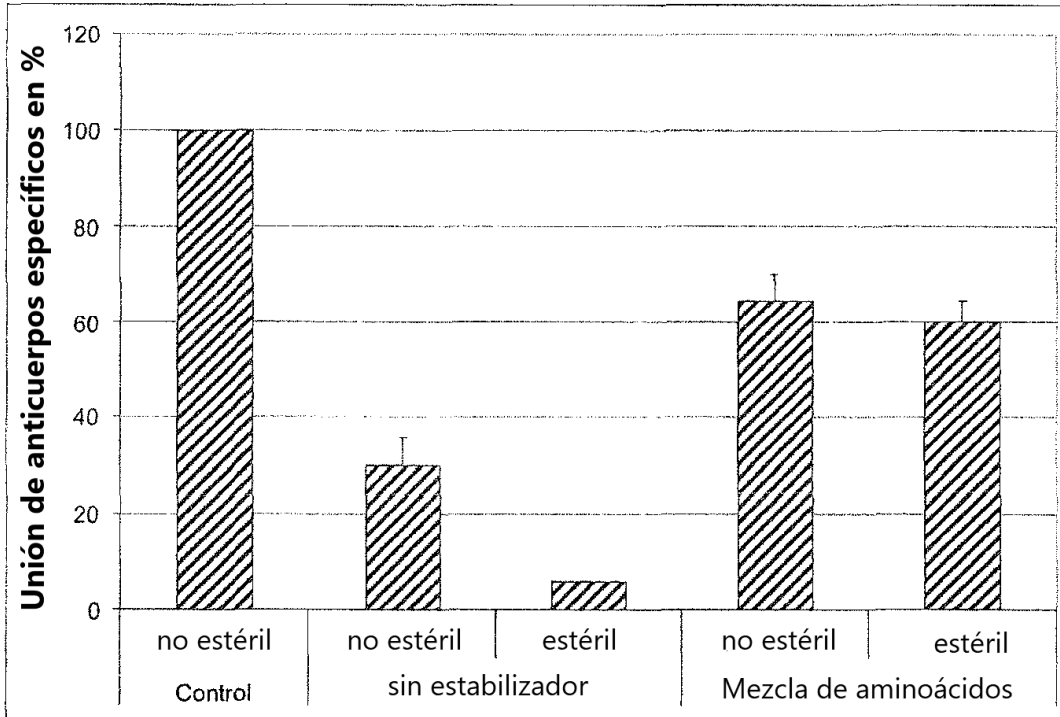


Figura 29

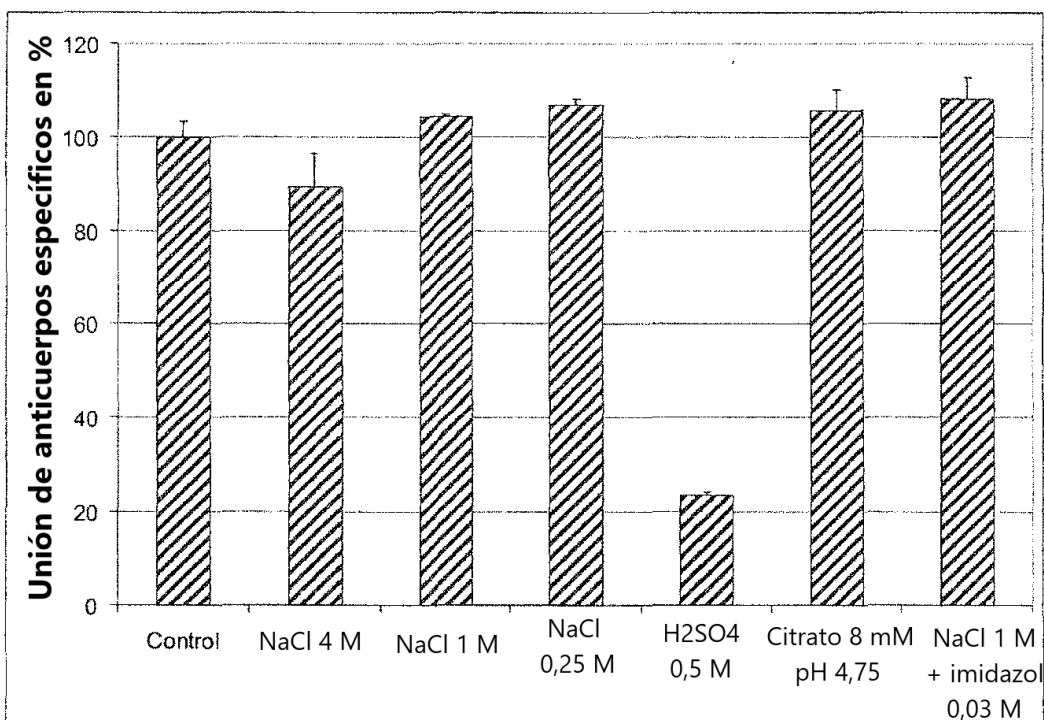


Figura 30

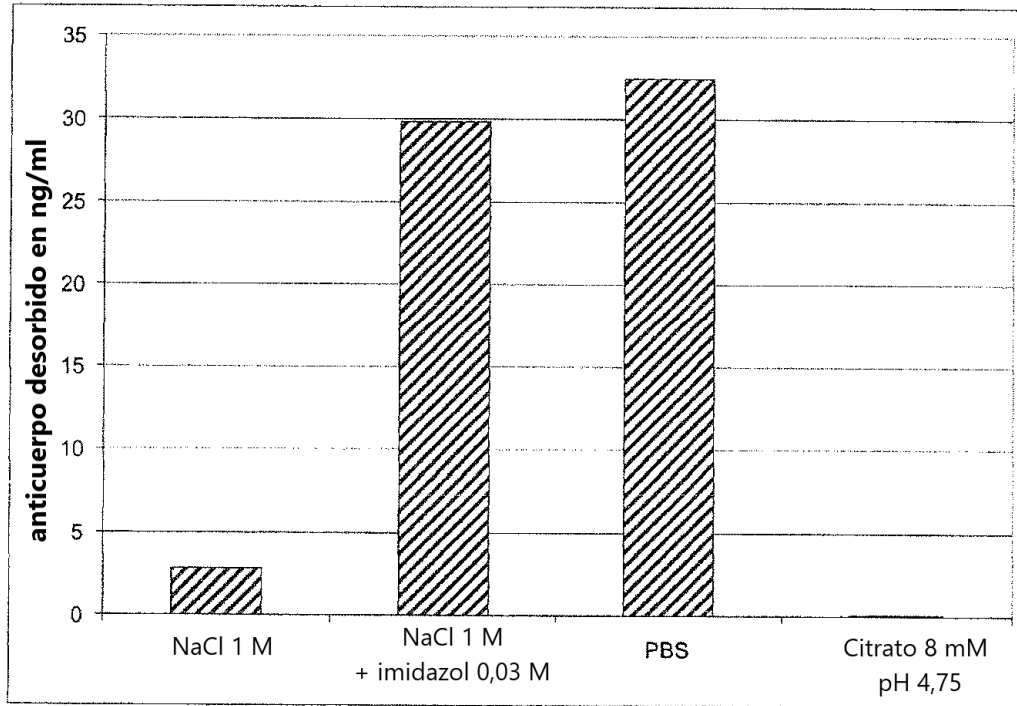


Figura 31

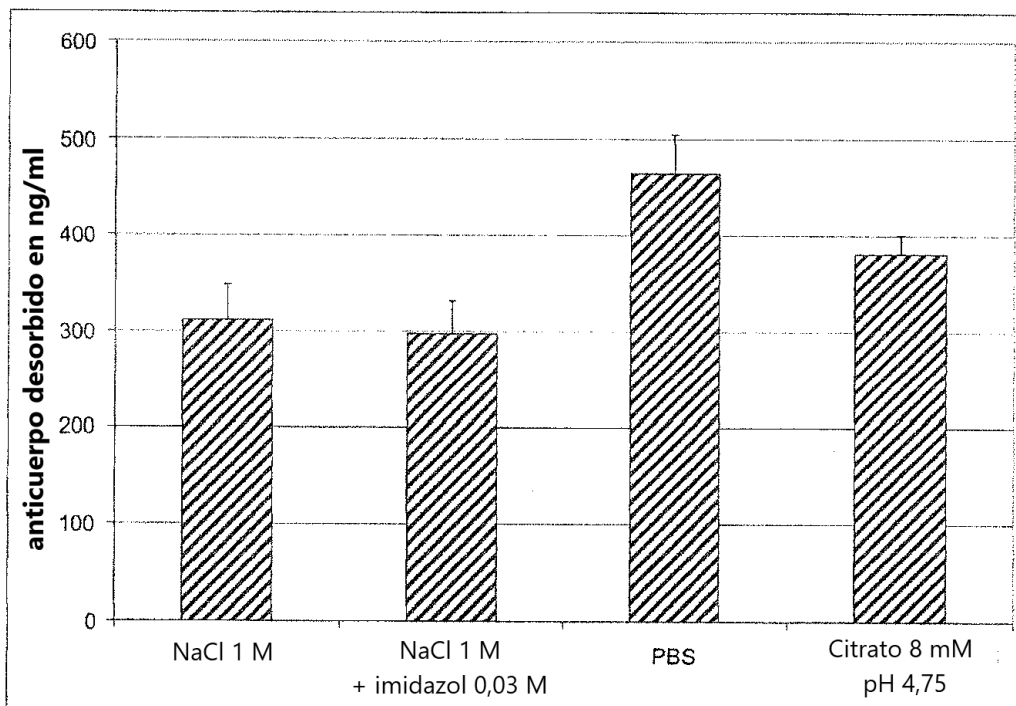


Figura 32

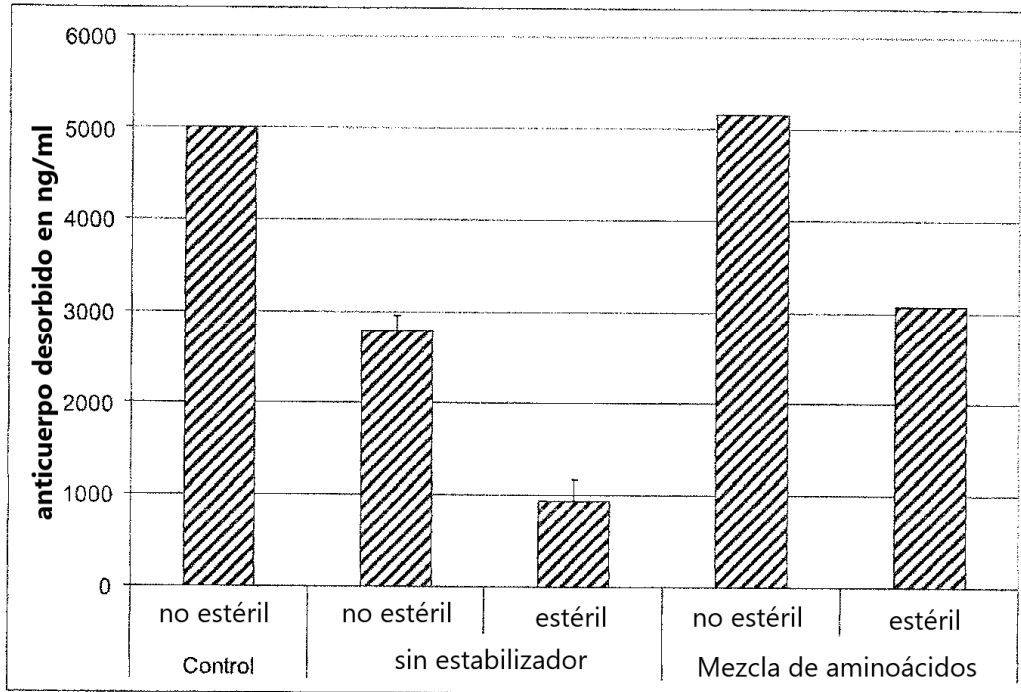


Figura 33

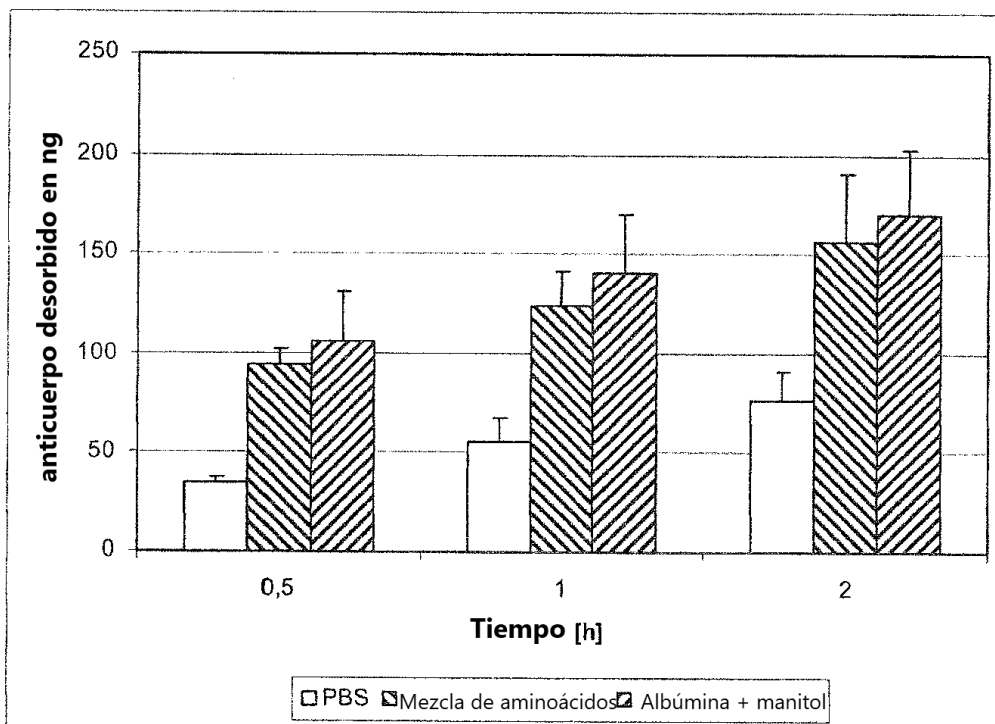
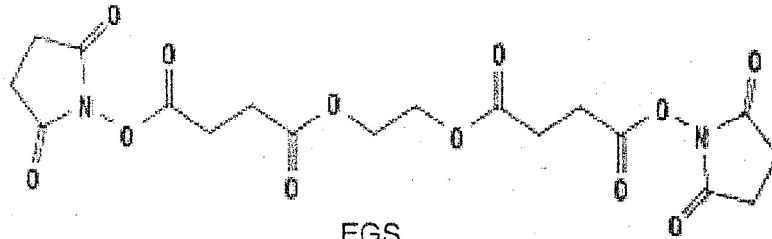
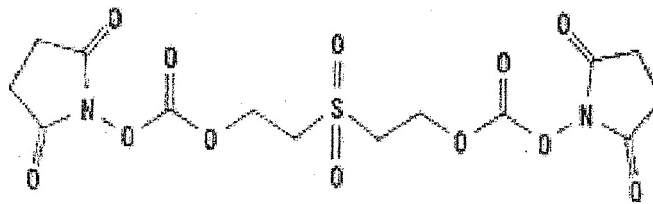


Figura 34



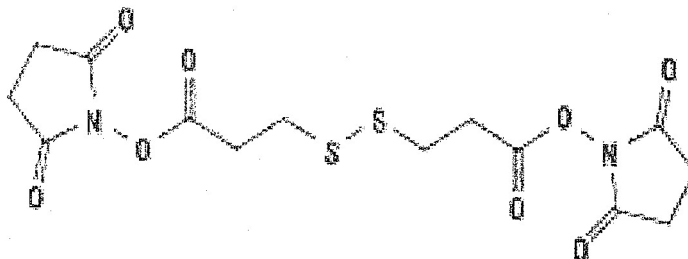
EGS
PM 456,36
Brazo espaciador 16,1 A

EGS (bis[succinimidilsuccinato] de etilenglicol)



BSOCOES
PM 436,35
Brazo espaciador 13,0 A

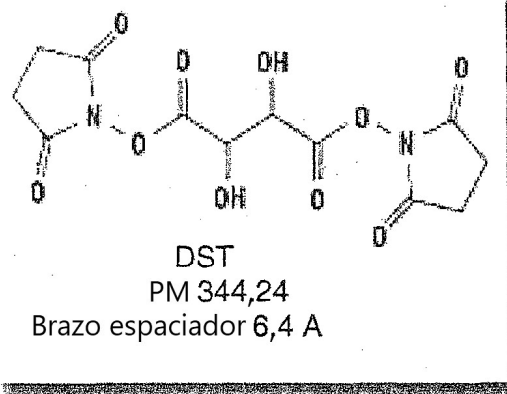
BSOCOES (bis[2-(succinimidooxicarbonilo)etil]sulfona)



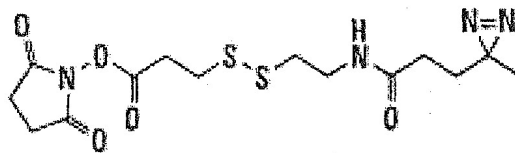
DSP
PM 404,42
Brazo espaciador 12,0 A

DSP (ditiobis[succinimidilpropionato])

Figura 34, continuación

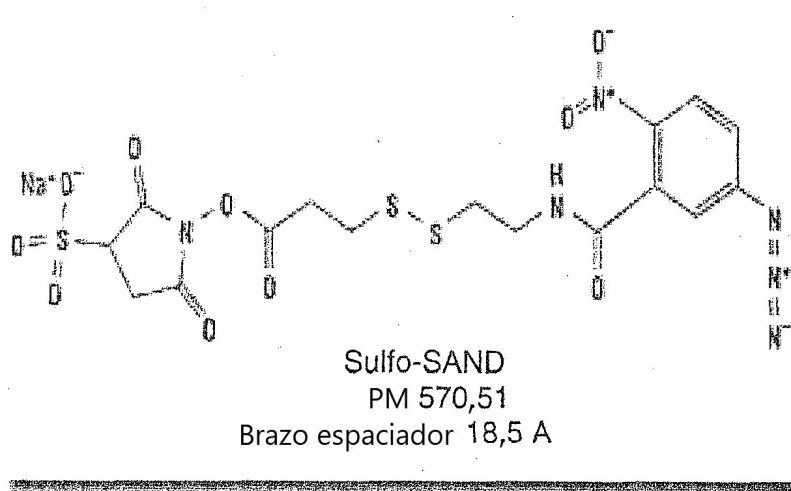


DST (tartarato de disuccinimidilo)



SDAD
(NHS-SS-diazirina)
PM 388,46
Brazo espaciador 13,5 A

2-([4,4'-azipentanamido]etil)-1,3'-ditiopropionato de succinimidilo



2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-etil-1,3'-propionato de succinimidilo